

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA**

**Identificación de polimorfismos del gen tlr4 en crías de  
alpacas con cuadros de neumonías por Pasteurella  
multocida**

**TESIS**

para optar el título profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

**Karol Patricia Guzmán Masias**

**Lima – Perú**

**2011**

A las personas que amo y  
que confían en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue posible gracias al financiamiento de INCAGRO formando parte del proyecto “Identificación y selección de marcadores moleculares de resistencia genética a enterotoxemia y neumonía en crías de alpacas”, al Consejo Superior de Investigación (CSI) y al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A mis padres por darme su apoyo incondicional y por enseñarme a perseguir mis sueños, a mi madre por su amistad y amor, a mi padre por sus consejos y enseñanzas. A mi hermano por sus enseñanzas diarias, por sus consejos y por su amistad. A mi familia, por mostrarme que la perseverancia y la unión, acompañado del amor y la confianza son los pilares básicos para crecer juntos, los amo.

Al Dr. Raúl Rosadio, Dr. Lenin Maturrano por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo y consejos.

Al Dr. Alberto Machego y la Dra. Hermelinda Rivera por brindarme las facilidades y equipos, y permitirme trabajar en las instalaciones del Laboratorio de Virología y Bacteriología de la FMV- UNMSM.

Al Dr. Víctor Zanabria y a los trabajadores del CIP-La Raya, por su hospitalidad durante mi estancia y las facilidades brindadas para la realización del muestreo.

Al Dr. Luis Guzmán y al Dr. Johan Smith de Vrije Universiteit Brussel por la colaboración y apoyo con los materiales.

A los productores alpaqueros de Macusani, Santa Lucía y Santa Rosa, por permitirme la recolección de las muestras, por sus enseñanzas de campo y su hospitalidad.

A Luis Luna, Antony Rodríguez, Álvaro Veliz, Hugo Castillo, Paloma Krugüer, Nidia Puray, David Pérez, Vanya Montenegro, Juan Manuel Aguilar, Isabel García, Juan More por su apoyo, colaboración, consejos y buenos momentos juntos.

A Lenin Benavides, por su inmensa paciencia, colaboración, cariño y constante apoyo incondicional, así como por los gratos momentos juntos y por las lecciones aprendidas.

A mis amigos y compañeros con los que compartí y aprendí “lecciones de vida”.

A Dinky, Taty, Lulú y Roco, que quienes con su fidelidad y compañía me ayudaron a definir mi profesión y siempre estuvieron y estarán en mi corazón.

A todos aquellas personas que no menciono, quiero que sepan que Muchas Gracias por su apoyo.

## CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN   | i    |
| ABSTRACT  | ii   |
| LISTA DE TABLAS   | iii  |
| LISTA DE FIGURAS  | iv   |
| ABREVIATURAS  | vi   |
| <br>  |      |
| 1. INTRODUCCIÓN   | 1    |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA                                 | 3    |
| <br>  |      |
| 2.1 Origen y Evolución                                    | 3    |
| 2.2 Anatomía e histología del pulmón                      | 4    |
| 2.3 Neumonías   | 5    |
| 2.3.1 Neumonías en crías de alpacas                       | 6    |
| 2.3.1.1 Manifestaciones clínicas                          | 8    |
| 2.3.1.2 Hallazgos macro y microscópicos                   | 8    |
| 2.3.2 Pasteurelisis Neumónica                             | 9    |
| 2.3.2.1 <i>Pasteurella multocida</i>                      | 10   |
| 2.3.2.2 <i>Mannheimia (Pasteurella) haemolytica</i>       | 13   |
| 2.3.2.3 Lipopolisacárido                                  | 16   |
| 2.3.3 Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV)          | 18   |
| <br>  |      |
| 2.4 Sistema Inmune  | 22   |
| 2.4.1 Respuesta Innata                                    | 22   |
| 2.4.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) | 23   |
| 2.4.3 Toll Like Receptor's (TLR's)                        | 24   |
| 2.4.4 Infecciones Pulmonares y TLR's                      | 28   |
| 2.4.5 TLR4  | 29   |
| 2.4.5.1 Estructura  | 29   |
| 2.4.5.2 Ligando y Función                                 | 29   |
| 2.4.5.3 Cascada de Señalización                           | 30   |
| 2.4.5.4 Alteración de la expresión del gen tlr4           | 34   |
| 2.4.6 Polimorfismos                                       | 34   |

|   |    |
|---|----|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS   | 39 |
| 3.1 Lugar de Muestreo   | 39 |
| 3.2 Animales  | 40 |
| 3.3 Toma de muestra   | 41 |
| 3.4 Aislamiento e identificación de agentes virales y bacterianos               | 41 |
| 3.5 Estudio Histopatológico   | 42 |
| 3.6 Extracción de ADN   | 42 |
| 3.7 Amplificación del gen <i>tlr4</i>   | 43 |
| 3.7.1 Diseño de cebadores   | 43 |
| 3.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)                                 | 43 |
| 3.7.3 Visualización del producto de PCR   | 44 |
| 3.7.4 Purificación del amplificado  | 44 |
| 3.8 Secuenciación y Análisis de Secuencias                                      | 45 |
| 3.9 Estudio del polimorfismo  | 45 |
| 4. RESULTADOS   | 46 |
| 4.1 Histopatología  | 46 |
| 4.1.1 Hallazgos Macroscópicos   | 46 |
| 4.1.2 Hallazgos Microscópicos   | 50 |
| 4.2 Aislamiento e identificación de <i>P. multocida</i> y <i>M. haemolytica</i> | 57 |
| 4.3 Identificación de BRSV  | 59 |
| 4.4 Interacción Virus – Bacterias   | 59 |
| 4.5 Análisis de Secuencias  | 60 |
| 5. DISCUSIÓN  | 68 |
| 6. CONCLUSIONES   | 72 |
| 7. LITERATURA CITADA  | 73 |
| 8. APENDICE   | 93 |

## RESUMEN

Las neumonías son la segunda causa de mortalidad en crías de alpacas, esta es causada por agentes virales y bacterianos que coexisten en los procesos infecciosos generando cuadros de neumonías agudas. *Pasteurella multocida* es la principal bacteria involucrada en las infecciones neumónicas en alpacas, seguida de *Mannhemia haemolytica*, ambos agentes generan cuadros hiperagudos en crías en época de parición, y afectando a crías más grandes en épocas de estrés. Sin embargo se ha demostrado su asociación con la presencia de virus neumopatógenos como BRSV. Los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) son proteínas transmembrana que se encuentran en diversos tipos celulares. Los genes que codifican esta proteína están altamente conservados a lo largo de las diferentes especies, siendo el TLR4 la proteína que reconoce al LPS, estructura que poseen todas las bacterias gram negativas (*Pasteurella multocida* y *Mannhemia haemolytica*) y a la proteína F del BRSV. En alpacas no se ha identificado la presencia de este gen, por lo que en el estudio se diseñaron cebadores para poder identificar la presencia del gen en esta especie. Al obtener la secuencia del gen en alpacas permitió analizar y comparar las secuencias obtenidas entre individuos y entre especies, observando el alto grado de conservación de la secuencia del gen *tlr4* entre especies. No se logró detectar polimorfismos tipo SNP entre animales enfermos y sanos, pero se pudo determinar SNP en individuos mostrando genotipos GT y GC.

Palabras Clave: alpacas, neumonías, *Pasteurella multocida*, *Mannhemia haemolytica*, BRSV, *tlr4*, polimorfismos.

## ABSTRACT

Pneumonias are the second leading cause of mortality of babies' alpacas; this is caused by viral and bacterial agents that coexist in infectious processes causing acute pneumonia. *Pasteurella multocida* is the main bacteria involved in pneumonia infections in alpacas, followed by *Mannhemia haemolytica*, both agents in hyperacute cases generate death of offspring during calving season and stressful times. However this association has the participation of differences virus likes BRSV. Toll-like receptors (TLR) are transmembrane proteins found in various cell types. The genes encoding this protein are highly conserved across different species. The protein TLR4 recognizes LPS, a structure which have all gram-negative bacteria (*Pasteurella multocida* and *Mannhemia haemolytica*) and the F protein of BRSV. In alpacas has not identified the presence of this gene, so that the study primers were designed to identify the presence of the gene in this species. We had obtained the sequence of the gene in alpacas allowed analyzing and comparing the sequences obtained between individuals and between species, noting the high degree of conservation of TLR4gene sequence between species. We could not to detect polymorphisms sort of SNP between sick and healthy animals, but we were able to determine SNP genotypes in individuals showing GT and GC.

Key Words: alpacas, pneumonia, *Pasteurella multocida*, *Mannhemia haemolytica*, BRSV, *tlr4*, polymorphism.



## **LISTA DE CUADROS**

- Cuadro 1: Cebadores de PCR diseñados
- Cuadro 2: Condiciones de PCR para amplicón de 621 bp
- Cuadro 3: Condiciones de PCR para amplicón de 345 bp
- Cuadro 4: Hallazgos Macroscópicos en campo
- Cuadro 5: Hallazgos Microscópicos
- Cuadro 6: Detección de agentes bacterianos en 57 neumonías agudas en alpacas
- Cuadro 7: Detección de agentes bacterianos en 53/57 neumonías agudas en alpacas
- Cuadro 8: Interacción de agentes bacterianos en neumonías agudas en alpacas
- Cuadro 9: Detección de BRSV en 6/25 neumonías agudas en alpacas
- Cuadro 10: Coexistencia de virus y bacterias en cuadros de neumonías agudas en alpacas
- Cuadro 11: Blast de la secuencia parcial de *tlr4* obtenida.
- Cuadro 12: Relación entre SNP's y agentes patógenos.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estructura del LPS
- Figura 2: Diagrama del Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) (Tomado de Valarcher y Taylor, 2007).
- Figura 3: y los diferentes ligandos con los que interactúan. Vista general del inicio de las respuestas  
proinflamatorias y antivirales por los TLR's, los cuales utilizan diferentes tipos de proteínas adaptadoras para dar inicio a los factores de transcripción. (Modificado de Carpenter y O'Neill, 2007)
- Figura 4: Cascada de señalización del TLR4, cuando el receptor es estimulado por LPS (Tomado de Silverman y Maniatis, 2001)
- Figura 5: Cascada de señalización del TLR4 y mecanismo moleculares cuando el receptor es estimulado por la Proteína F del RSV, obsérvese el primer diagrama de la célula de la derecha. El RSV se adhiere a las células epiteliales respiratorias a través de glicosaminoglicanos y posiblemente otros receptores. La interacción de la proteína F con TLR4 conduce a la activación de NF- $\kappa$ B a través de la vía dependiente e independiente del Myd88, para la transcripción de citoquinas (Tomado de Valarcher y Taylor, 2007).
- Figura 6: Molécula de ADN 1 es diferente a la molécula 2 por la variación en un par de base (C/T)
- Figura 7: Ubicación de los lugares de muestreo
- Figura 8: Pulmones mostrando consolidaciones multifocales principalmente en lóbulos posteriores (severa y extensiva bronconeumonía).
- Figura 9: Tejido pulmonar con consolidaciones rojizas en áreas ventrales de los lóbulos craneal y cardíaco.
- Figura 10: Pulmón presentando consolidaciones craneo ventrales en lóbulo anterior.
- Figura 11: Pulmones mostrando consolidación focal y formaciones de bulla enfisematosa (flecha)
- Figura 12: Pulmones con consolidaciones focales y presencia de material espumoso intratraqueal.
- Figura 13: Tejido pulmonar evidenciando una severa congestión difusa comprometiendo extensivamente el lóbulo posterior derecho.

- Figura 14: Obsérvese presencia de depósitos de fibrina distorsionando el parénquima pulmonar e infiltrado con exudado inflamatorio (10X) (Flechas)
- Figura 15: Pérdida de la estructura bronquial, presencia de mucus, células inflamatorias y eritrocitos dentro de los bronquios (Flecha). Paredes alveolares con infiltración de linfocitos y células inflamatorias (10X)
- Figura 16: Descamación del epitelio bronquiolar, así como la pérdida de la estructura células (10X) (Flechas).
- Figura 17: Tejido pulmonar con pérdida de la arquitectura alveolar y asociada con una extensiva congestión, extravasación de eritrocitos e infiltración inflamatoria (10X).
- Figura 18: Parénquima pulmonar con extensiva ruptura de paredes alveolares (enfisema) (10X).
- Figura 19: Tejido pulmonar mostrando agregado linfocítico en zona peribronquial (10X).
- Figura 20: Cromatograma del *gen tlr4* de una alpaca sana.
- Figura 19: Tejido pulmonar mostrando agregado linfocítico en zona peribronquial. Muestra positiva a *P.multocida*, *Streptococcus sp.* y BRSV
- Figura 21: Secuencia consenso determinando los SNP's propios del individuo
- Figura 22: Alineamiento de las secuencias de *tlr4* de diferentes especies. Las secuencias altamente conservadas (indicado por los asteriscos (\*)).
- Figura 23: Cladograma de las secuencias de *tlr4* entre especies
- Figura 24: Alineamiento de las secuencias consenso de *tlr4* de 5 individuos, obsérvese la presencia de SNP's entre individuos. La letra K indica que en esa posición podría haber una G/T.
- Figura 25: Alineamiento de la secuencia *in silico* de la proteína TLR4 de alpaca con secuencias de TLR4 de otras especies. Los dos puntos (:), indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas, el punto (.), indica sustituciones menos conservativas en las secuencia evaluadas.
- Figura 26: Cladograma de secuencia de la proteína TLR4 entre especies.
- Figura 27: Composición aminoacídica del *tlr4* de alpaca, basado en la secuencia *in silico* de la proteína
- Figura 28: Composición aminoacídica del *tlr4* de porcino, basado en la secuencia de la proteína
- Figura 29: Composición aminoacídica del *tlr4* de bovino, basado en la secuencia de la proteína

## ABREVIATURAS

Kdo: Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico

TLR: Toll like receptor's

*tlr4*: gen del TLR4

MyD88: Factor 88 de diferenciación mieloide (myeloid differentiation factor 88)

TIRAP: Dominio que contiene la proteína adaptadora TIR (TIR domain-containing adapter proteína)

Mal: Adaptador tipo MyD88 (MyD88 adapter-like)

TRIF: (TIR domain-containing inducing interferon IFN- $\beta$ )

TICAM-1: Dominio que contiene la proteína adaptadora molécula 1 (TIR domain-containing adapter molecule-1)

TIRP: (TIR-containing protein)

TICAM-2: (TRIF-related adapter molecule)

TRAM: (TRIF-related adapter molecule)

LBP: Proteína de unión al LPS

PRR: receptores de reconocimiento de patrón

ODC: Ornitina decarboxilasa

NF- $\kappa$ B: factor de transcripción nuclear –  $\kappa$ B

Nota:

TIRAP/Mal, TRIF/TICAM-1, TIRP/TRAM/TICAM-2: todas son proteínas adaptadoras de TLR.

## 1. INTRODUCCION

En el Perú, la crianza de camélidos sudamericanos constituye una importante fuente de ingresos económicos para las empresas asociativas, pequeños productores y comunidades campesinas de la región andina (Ameghino y DeMartini, 1991). La productividad de esta ganadería, sin embargo, no es la adecuada pues sufre endémicamente de una elevada mortalidad de crías y baja natalidad (Ramírez, 1991). Las enfermedades infecciosas, principalmente los procesos entéricos y neumónicos, constituyen las dos principales causas de mortalidad neonatal durante las primeras semanas de vida (Ramírez, 1991; Melo, 1997; Victorio *et al*, 2003).

Las neumonías son causadas por diferentes agentes bacterianos y virales, con una clara predominancia de las interacciones de Virus Respiratorio Sincital Bovino (BRSV) y/o Virus de la Parainfluenza Tipo 3 (PI3) asociados con *Pasteurella multocida* y/o *Mannheimia hemolítica* (Calsín, 2008; Rosadio *et al.*, 2011).

Los hospederos responde inicialmente a agentes patógenos con una reacción inmune de tipo innata, este tipo de respuesta depende fundamentalmente de la habilidad de reconocer componentes extraños y de iniciar una respuesta inflamatoria (Tizard, 2002). Así, presentan receptores de reconocimiento de patrón (PRR), entre estos los “Toll-like receptors” (TLRs) que son un tipo de proteínas que se encuentran en las células del sistema inmune y que cumplen la función de receptores de membrana tipo 1 (Akira, 2003). Existen diferentes tipos de TLRs, de los cuales se han logrado identificar en la actualidad a 13 tipos (Uematsu y Akira., 2006), cada uno con diferentes funciones y comprometidos en conjunto con la inmunidad innata del individuo a fin de reconocer los diversos patógenos que pudieran afectarlo (Ma *et al.*, 2004).

El TLR involucrado en la inmunidad innata frente a bacterias gram negativas (Lipopolisacárido) y al Virus Respiratorio Sincital (RSV) (proteína F) es el TLR4 (Lee *et al.*,

2005, Kurt-Jones *et al.*, 2000, Valarcher y Taylor, 2007). El *tlr4* se ha detectado en células del sistema inmune de diferentes especies de animales domésticos como ratón, perro, gato, cerdo, bovino y gallina. (Bautista y Mosqueta, 2004).

Diversos estudios han demostrado que el dominio extracelular del TLR4 resulta ser altamente polimórfico (Smirnova *et al.*, 2000). En investigaciones de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en cerdos, se encontró que existen 13 SNP's en el gen *tlr4* (Shinkai *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en humanos han detectado mutaciones sin sentido (missenses) que afectan el dominio extracelular de esta proteína siendo asociado a la sensibilidad del LPS, demostrando que los cambios en la secuencia genética pueden alterar la habilidad del hospedero en su respuesta hacia el estrés medioambiental (Arbour *et al.*, 2000). Así mismo en pollos las variaciones genéticas del *tlr4* han sido asociadas a susceptibilidad frente a infecciones con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, sugiriendo posibles asociaciones entre mutaciones inmunogenéticas y susceptibilidad a determinadas infecciones bacterianas fatales. (Leveque *et al.*, 2003).

Consecuentemente, el presente estudio tuvo como objetivo principal detectar la presencia del gen *tlr4* en alpacas, buscando asociar posibles mutaciones del gen en el desencadenamiento de procesos neumónicos agudos en crías de alpacas, buscando identificar los agentes virales y bacterianos que generan estos procesos neumónicos y que a su vez estimulen el receptor.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origen y Evolución

Los camélidos de América del Sur pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Ruminantia, familia Camelidae y están representados por la vicuña (*Vicugna vicugna*), el guanaco (*Lama guanicoe*), la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Hacks, 2001; Wheeler *et al.*, 1992).

La historia evolutiva de la alpaca (*Vicugna pacos*) se inicia con la aparición de los camélidos ancestrales en América del Norte al final del Plioceno, hace tres millones de años. Luego de su migración a través del estrecho de Bering hacia África y Asia, evolucionaron para formar la tribu de los Camelini, que comprende al camello Bactriano Moderno (el cual habita en Asia y presenta dos jorobas) y al Dromedario o camello con una joroba (que se encuentra en el Cercano Oriente y Norte de África). Asimismo, otro grupo migró hacia el sur a través del Istmo de Panamá y se distribuyó en América del Sur, donde surgió la tribu de los Lamini (Wheeler, 1991).

La alpaca es un recurso importante para los países altoandinos, especialmente para el Perú que posee aproximadamente tres millones de ejemplares los cuales habitan principalmente en el altiplano del país. La importancia de la alpaca radica en la calidad y fineza de su fibra, los altos valores proteicos de su carne, su bajo contenido de colesterol y grasas. Posee además algunos valores escondidos tales como la sangre en la industria piscícola, huesos y heces como abono agrícola y su piel en el arte de la curtiembre (Hacks, 2001).

## 2.2 Anatomía e Histología del Pulmón

Los pulmones de la alpaca debido a la ausencia de cisuras interlobulares, son semejantes a los pulmones del camello y el equino (Fowler, 2010; López, 1993; Viera *et al.*, 1968). El pulmón derecho presenta una formación a manera de lengüeta, la que por analogía de situación corresponde al lóbulo azygos, descrito en otras especies (Viera *et al.*, 1968). El pulmón izquierdo es ligeramente más pequeño que el derecho, la diferencia radica principalmente en el vértice pulmonar izquierdo que es de menor tamaño, delgado y presenta una proyección aguda, a comparaciones del vértice pulmonar derecho (López, 1993).

La tráquea a la altura de la tercera costilla, da origen a un pequeño bronquio que penetra en el parénquima pulmonar y se incurva en dirección craneal ventilando al vértice del pulmón derecho. Luego, la tráquea se divide en dos grandes bronquios que se dirige a sus respectivos hilios (Viera *et al.*, 1968). Cada uno de los bronquios principales se divide en un bronquio apical, bronquio cardíaco y un largo bronquio diafragmático (Fowler, 2010). El mediastino es completo y la línea diafragmática desarrolla un reflejo pleural seguido de una línea craneal a la unión costochondral y cruza la porción media de las últimas costillas en el final dorsal caudal a la penúltima costilla (Fowler, 2010).

A nivel histológico, el estudio realizado por López (1993) menciona que el pulmón de la alpaca presenta una pleura gruesa, la cual está conformada por dos capas una serosa constituida por células planas mesoteliales, seguida de una capa fibroelástica y una capa laxa que se relaciona de manera directa con el parénquima pulmonar. Los bronquios intrapulmonares están conformados por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, que alternan con células cilíndricas y células basales, la característica más importante es la ausencia de glándulas seromucosas en esta región. El músculo liso es de disposición circular y discontinua. La capa fibrocartilaginosa y adventicia no presenta mayores diferencias a otras especies. El bronquio carece de cartílago y presenta una mucosa con pliegues longitudinales con un epitelio cilíndrico conformado por células cilíndricas y células secretoras activas, cuya secreción se acumula en forma de grumos en el lumen, la capa muscular está dispuesta en forma circular u oblicua, la capa adventicia es delgada con escaso tejido conectivo.

En el bronquiolo terminal el epitelio es cúbico ciliado, luego en el bronquiolo respiratorio las células cúbicas pierden los cilios, para continuar con el conducto alveolar donde el epitelio cambia a simple plano. Cada conducto alveolar desemboca en un saco alveolar (conjunto de alveolos), el tabique interalveolar esta constituido por dos capas epiteliales, separado por escaso



tejido conectivo el cual contienen los capilares. Se puede distinguir dos tipos de células en estos septos: células epiteliales (tipo I) de núcleos aplanados y oscuros, y células septales (tipo II) con núcleos globosos y más claros.

### 2.3 Neumonías

La neumonía es la inflamación del parénquima pulmonar, que se acompaña normalmente de la inflamación de los bronquiolos y, a menudo, de pleuritis. Esta puede ser causada por virus, bacterias o una combinación de ambos, hongos parásitos metazoos y agentes físicos o químicos. Se manifiesta clínicamente por un aumento de la frecuencia respiratoria, cambios en la profundidad y el carácter de las respiraciones, tos, sonidos respiratorios anormales en la auscultación y, en la mayoría de las neumonías bacterias, por signos de toxemia. (Radostis *et al.*, 2002).

Las enfermedades respiratorias en terneros son consideradas de origen multifactorial siendo el resultado de la interacción entre los microorganismos infecciosos, mecanismos de defensa del hospedero, interacción con el medio ambiente y el estrés (Roy, 1990; Wikse y Baker, 1996). Así mismo la interacción de varios agentes en los procesos neumónicos se han evidenciado en ovinos (Martin, 1996) y en los últimos años en camélidos sudamericanos, especialmente en alpacas (Rosadio *et al.*, 2011).

Las neumonías agudas bacterianas en ovinos son generadas por *Mannheimia haemolytica*, siendo los isotipos A y T los más reconocidos. El serotipo A esta asociado a los cuadros típicos de pasteurellosis, mientras que el serotipo T es asociado a cuadros de toxemia y bacteriemia en corderos (Gilmour, 1978). En el Perú se han aislado *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* (hoy *Mannheimia haemolytica*) de tejido pulmonar de ovinos (Rosadio, 1990) y alpacas (Calsin, 2008; Rosadio, 2011), confirmando los reportes previos de la presencia de estas bacterias en casos de neumonías agudas en Perú

Las enfermedades respiratorias en ovinos suelen ser causadas principalmente por dos virus Parainfluenza tipo 3 (PI3) y adenovirus. Siendo PI-3 el que ha sido aislado con mayor frecuencia, sin descartar la presencia de BRSV. En bovinos la presencia de estos tres virus y otros agentes virales como Coronavirus Bovino (BCV) y el Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa bovina (IBR) están asociados a infecciones bacterianas por *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma dispa*, *Haemophilus somnus* (Hartel *et al.*, 2004; Trigo, 1987).

En alpacas la presencia de *P. multocida* y *M. haemolytica*, se ve asociada a infecciones virales causadas por PI-3 y BRSV, siendo *P. multocida* y PI-3 los agentes con mayor índice de presentación en los cuadros de neumonías agudas. No se ha logrado aislar los virus neumopatógenos pero si se han identificado los antígenos virales en los tejidos pulmonares, estableciendo coexistencia de virus y bacterias en procesos patológicos neumónicos en esta especie. (Calsín, 2008; Rosadio *et al.*, 2011).

### 2.3.1 Neumonías en crías de alpacas

Las enfermedades respiratorias son muy importantes en los problemas de salud en camélidos. Estas disminuyen la producción y pueden llegar a ser causal de mortalidad. Problemas de tos, secreción nasal y la dificultad respiratoria son signos clínicos de que esta existiendo algún problema respiratorio (Köhler *et al.*, 2001).

Los procesos neumónicos suelen constituir una de las principales causas de muerte en crías de alpacas. La *Pasteurella multocida* es un microorganismo normal de la flora nasal de alpacas adultas (Rodríguez y Mimbela, 1981; Barsallo, 1985); pero se conoce también de su patogenicidad en diversas especies de animales domésticos. En un estudio realizado con 26 muestras de casos diagnosticados en el campo como muertos por neumonía en crías de alpacas, se aisló *P. multocida* en 11 de ellas (42.3%) procedentes de dos empresas asociativas de departamento de Puno (Ameghino y Calle, 1989; Ameghino, 1990). Por dichos hallazgos se ha planteado que este microorganismo está comprometido en la ocurrencia de estos procesos pulmonares, incluyendo posteriormente la participación de *Pasteurella haemolytica* (hoy *Mannheimia haemolytica*) en estos procesos (Ameghino y DeMartini, 1991).

Otro estudio identificó agentes infecciosos aislados de 30 pulmones de alpacas adultas y crías los cuales fueron *Mycoplasma sp.* (26.6%), Estafilococos alfa hemolíticos (100%), Estreptococos alfa hemolíticos (83.33%), *Klebsiella sp.* (60%) (Arratia y Herrera, 1992). En estudios de laboratorio de estos procesos neumónicos se ha encontrado que en nuestro medio actúan como microorganismos invasores: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria spp.* y *E. coli*. En el caso de micoplasmas, debe señalarse que en estudio serológico realizado en alpacas, llamas y vicuñas, se encontraron sero-reactores en las tres especies de camélidos sudamericanos a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* y *Mycoplasma mycoides* subsp.

*capricolium*, estos hallazgos sugieren que microorganismo de este medio pueden estar asociados con procesos neumónicos en nuestros camélidos (Hung *et al.*, 1988)

De acuerdo a estudios serológicos en alpacas se ha identificado la presencia de animales sero-reactores a ciertos agentes virales de localización pulmonar. Como son los de la Parainfluenza tipo 3 (PI-3) y el Virus respiratorio sincitial bovino (BRSV). (Rivera *et al.*, 1987; Victorio *et al.*, 2003). A su vez, Victorio *et al.* (2003) identificaron la presencia anticuerpos contra Herpesvirus Bovino tipo 1, en una prevalencia muy baja en comparación a otro estudio realizado en alpacas de crianza mixta, en los cuales la prevalencia era mucho mayor (Manchego *et al.*, 1998). La importancia de estos hallazgos radica en que los agentes virales referidos actúan en otras especies de animales domésticos produciendo lesiones pulmonares, incluyendo neumonías (Sharp, 1983). Aun siendo pequeñas las lesiones que pudieran originar, se sabe que estas favorecen el ingreso de microorganismos oportunistas, como son los del género *Pasteurella* y otros.

Un estudio mas reciente demostró que las neumonías agudas suelen constituir una de las principales causas de los altos índices de mortalidad en crías de alpacas. Estas son causadas por diferentes agentes bacterianos y virales que interactúan entre sí generando infecciones mixtas (PI3 y BRSV coexistentes con *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*), favoreciendo la proliferación bacteriana (Calsín, 2008).

Los procesos neumónicos ocurren generalmente después de ciertos periodos de estrés, o en animales con poca vitalidad, los cuales se acentúan factores predisponentes a los que están expuestas. Entre estos se considera las caídas de nevada, granizada y lluvias que ocasionan enfriamiento de medio ambiente, y las largas caminatas de las crías cuando siguen a sus madres para las diferentes actividades ganaderas (baños, dosificaciones, esquila u otras). Asimismo, las neumonías son bastante frecuentes en crías que padecen de inanición. También se ha visto en la práctica que las crías de la raza suri son más susceptibles que de la raza huacaya. La alta incidencia de neumonías en los primeros días de nacidos hace pensar que quizás podrían deberse a la aspiración de líquido amniótico al momento del parto, o de leche por falsa deglución (Ameghino y DeMartini, 1991).

La mortalidad mensual en crías en siete años muestra una tendencia cíclica e irregular, cuyos valores más elevados correspondieron a los meses de enero (9.5%), febrero (17.5%), marzo (2.2%). Este hecho nos demuestra que las crías entre el nacimiento y los dos primeros meses de vida exigen mayor cuidado y un adecuado programa de prevención y control de sus

enfermedades. Entre las causas de mortalidad en crías de alpacas se encuentra en primer lugar la muerte por enfermedades infecciosas que constituyen los principales problemas sanitarios seguidos por afecciones orgánicas. El porcentaje de mortalidad en crías de alpacas en Puno entre los años 1973 -1979 tenía a las neumonías como principal causa con un 1.9-27.5% y en tuis se encontraba en segundo luego de la fiebre de alpaca con un 3.2-26.3 % (Ramírez, 1989).

#### 2.3.1.1 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas suelen ser tos, estornudos, dificultad para respirar o beber, frecuencia respiratoria aumentada (sobre los 10-15 veces por minuto), dilatación de los ollares, secreción nasal, lagrimeo, producción excesiva de saliva, anorexia y fiebre (Köhler *et al.*, 2001)

En casos hiperagudos de neumonías los animales amanecen muertos, no obstante de haber estado aparentemente saludables el día anterior. En casos menos severos puede observarse depresión, orejas dirigidas hacia atrás y anorexia; puede haber o no secreción por la nariz, tos, elevación de temperatura corporal y respiración superficial. A la auscultación se aprecia la presencia de exudado en los pasajes aéreos. La muerte puede ocurrir entre 1 y 3 días después de aparecer las manifestaciones clínicas, y probablemente por una toxemia a partir de las lesiones pulmonares o por hipoxia pulmonar (Ameghino y DeMartini, 1991).

Además, cabe resaltar que en un estudio realizado por Garmendia y colaboradores (1987) encontró que la mayoría de casos de crías muertas por neumonía registraron niveles de inmunoglobulinas relativamente bajos. Es decir que hubo falla completa o parcial en la transferencia de dichas inmunoglobulinas a través del calostro. Existe una estrecha correlación entre la mortalidad y la cantidad de anticuerpos en el suero sanguíneo.

#### 2.3.1.2 Hallazgos macro y microscópicos

En el campo se observan cuadros septicémicos, los que probablemente corresponden a la fase hiperaguda de pasteurelosis. Algunas veces hay eliminación de sangre por las fosas nasales. Existen petequias en las subserosas debajo del epicardio y endocardio. También puede encontrarse estas mismas lesiones en el hígado, bazo y ganglios linfáticos.

Lo más frecuente son los casos de neumonía localizada, que correspondería a cuadros de pasteurelosis neumónica. Incluso puede haber pleuritis, con adherencia fibrinosa a las paredes intercostales internas. También suele haber bronconeumonía, que se caracteriza por la presencia de exudado sero-fibrinoso o purulento en los bronquiolos y congestión pulmonar o áreas de hepatización (Ameghino y DeMartini, 1991).

El estudio de lesiones macroscópicas en un estudio de 30 muestras de pulmones de alpacas obtenidas en camales, se hallaron lesiones como enfisema alveolar (42.8%), bronquitis enfisematosa (5.7%), neumonía fase congestiva 34.2%, fase de hepatización roja (14.2 %), neumonía intersticial crónica (2.8 %) (Abarca y Málaga, 1986).

En un estudio realizado con 50 muestras de pulmones de crías muertas por procesos neumónicos, al examen histopatológico se determinaron las siguientes alteraciones neumónicas: neumonía roja (42%), congestión pulmonar (26%), bronconeumonía (14%), edema pulmonar (6%) y neumonía purulenta embólica (4%) (Tapia y Málaga, 1989).

Otro estudio de 27 muestras de pulmón de crías de alpacas de 4 a 35 días de edad muertas por procesos respiratorio con lesiones pulmonares, determinó el hallazgo de neumonía intersticial hemorrágica, neumonía hemorrágica, neumonía sero-hemorrágica, neumonía fibrino-hemorrágica, neumonía sero-fibrino-hemorrágica, bronconeumonía fibrino-hemorrágica, enfisema pulmonar. En la mayoría de las lesiones los cambios observados en el parénquima pulmonar reflejan un severo daño vascular con extravasación sanguínea. En los casos de bronconeumonía fibrino hemorrágica se observaron estructuras cocobacilares compatibles con nidos bacterianos (Perales *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Pasteurelosis Neumónica

Las pasteurelosis neumónica bovina es comúnmente asociada con *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica* y *Pasteurella multocida*, siendo *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica* (serotipo A1) la bacteria más representativa en estos cuadros (Donachie, 2000), *Pasteurella multocida* (serotipo B6) suele generar cuadros de septicemia hemorrágica en bovinos.

En ovinos los cuadros de pasteurelosis neumónica se ven asociados a la presencia de ambas bacterias, predominando *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica* en los aislados (Quinn *et al.*, 2001).

Sin embargo los cuadros neumónicos en alpacas causados por especies del género *Pasteurella* se han visto asociados en mayor proporción a *Pasteurella multocida*, siendo la bacteria aislada con mayor frecuencia, seguida de *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica* (Calsín, 2008; Rosadio *et al.*, 2001).

#### 2.3.2.1 *Pasteurella multocida*

*P. multocida* es una especie bacteriana muy heterogénea, en la que se han descrito muchas variantes fenotípicas en relación a pruebas claves para su clasificación, tales como la ornitina decarboxilasa (ODC), indol, sacarosa, manitol y maltosa (Heddleston, 1976; Petersen *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005). Además, las cepas de esta especie gran variación respecto a la morfología de las colonias y especificidad de antígenos (Carter, 1967; Boyce *et al.*, 2004). Existen tres subespecies de *P. multocida*: *subsp. multocida*, *subsp. septica* y *subsp. gallicida*, siendo la subespecie *multocida* la más frecuente en todo tipo de hospedadores.

*P. multocida* puede causar enfermedad en un amplio rango de especies de animales y es el agente causal de enfermedades como el cólera aviar, septicemia hemorrágica bovina, neumonía enzoótica y rinitis atrófica. (De Alwis, 1992). Puede ser el agente primario o secundario involucrado en la neumonía del ganado vacuno (en su mayoría causados por el serotipo A: 1), los cerdos y, en ocasiones, las ovejas (Gilmour, 1978; Chanter y Rutter, 1989; Frank, 1989). También puede infectar conejos dando lugar a rinitis y neumonía (Manning *et al.*, 1989). Además, *P. multocida* es la mayor causa de infecciones de etiología bacteriana producidas por mordedura de animales en humanos (Arons *et al.*, 1982; Westling *et al.*, 2006).

Las especies de *Pasteurella* fueron identificadas como bacilos, gramnegativos, aeróbicos, no motiles, con ausencia de crecimiento en agar MacConkey, ureasa negativos, indol positivos, nitrato positivo, y ornitina descarboxilasa positivo, y producen ácido de glucosa, ribosa y sorbitol, pero no de xilosa, maltosa, lactosa, manitol, sucrosa, dulcitol, trialosa o arabinosa. (Capitini *et al.*, 2002; Rimler y Glisson, 1997). Es una bacteria oxidasa positivo, no hemolítica y salvo excepciones, requiere factor V de crecimiento (Krause *et al.*, 1987; Sneath y Stevens, 1990).

En agar sangre las colonias que crecen son pequeñas, circulares y convexas, su tamaño varía de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente de aspecto mucoso, grisáceo o blanquecino y de olor *sui generis* (como consecuencia de la producción de indol) (Rimler y Glison, 1997; Koneman *et al.*, 1999).

El desarrollo de la neumonía causada por *P. multocida* es asociada con factores medio ambientales y de estrés tales como hacinamiento, crianza mixta, transporte y otros, así como las infecciones bacterianas y virales concurrentes o predisponentes. Las lesiones pulmonares consisten en aguda o subaguda bronconeumonía que podría estar o no asociada a pleuritis. (Dabo *et al.*, 2008).

*P. multocida* serogrupo A, está asociada a procesos neumónicos agudos en terneros, generando la enfermedad clínica y lesiones pulmonares menos severas que *M. haemolytica*. Como se comprobó en el estudio de 27 pulmones neumónicos de terneros de 1 a 4 semanas de edad, se obtuvieron 27 cepas de *P. multocida* (19.6%), la totalidad de estas pertenecieron al serogrupo A (Jaramillo *et al.*, 1987); en otro estudio más reciente de 57 muestras patológicas pulmonares de becerras, se aisló *P. multocida* en 21 animales, siendo todas las cepas clasificadas en el serogrupo A (Piojan *et al.*, 1999).

*Pasteurella* spp. forma parte de su flora nasofaríngea normal, pero debido a las condiciones de estrés y otras enfermedades concurrentes (ej. infecciones virales respiratorias) facilitan la proliferación de *Pasteurella* spp. en la nasofaringe, ocurriendo entonces inhalación de microgotas conteniendo bacterias, las cuales se depositan en los alvéolos. Los animales en buen estado de salud fagocitan eficientemente *Pasteurella* sp. pero aquellos animales enfermos o bajo condiciones de estrés, pueden desarrollar neumonía (Yates, 1982).

La lesión pulmonar de *Pasteurella* sp. se inicia a nivel del bronquiolo respiratorio, mientras que la difusión de la infección ocurre principalmente a través del tejido conjuntivo que rodea bronquios, vasos sanguíneos y linfáticos, así como por los septos interlobulillares (Dungworth, 1985).

La lesión típica es una bronconeumonía craneoventral, afectando en ocasiones más del 50% de la superficie total pulmonar, y se ha caracterizado simplemente como bronconeumonía por algunos autores (Haritani *et al.*, 1989; Mathy *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2006; López, 2007) o como una bronconeumonía en la que se denota el grado y el tipo de exudado. Estos incluyen fibrino aguda (Gagea *et al.*, 2006), subaguda a crónica fibrinopurulenta (Mosier, 1997),

fibrinosa a fibrinopurulenta (Dungworth, 1985), supurativa y fibrino-necrotizante (Tegtmeier *et al.*, 1999).

La pleura contiene un exudado fibrinoso o serofibrinoso, con los septos interlobulillares dilatados debido al depósito de fibrina y edema. Los bronquios contienen fibrina, edema, o bien, exudado purulento. Al corte del pulmón se observa consolidación (solidificación) roja en la fase aguda, a veces con hemorragias; mientras que en la etapa crónica se aprecia consolidación gris, a veces acompañada de algunos abscesos multifocales y adherencias pleurales (Dungworth, 1985; Rehmtulla y Thomson, 1981; Schiefer, 1978; Yates, 1982). López (2007) designó a la lesión asociada a *P. multocida* como broncointersticial a bronconeumonía en función de si hubo o no infección viral concurrente.

Los cambios histológicos consisten normalmente en los bronquios y bronquiolos llenos de neutrófilos, macrófagos y epitelio necrótico entremezclado con una pequeña cantidad de fibrina (Dungworth, 1985; Jericho y Carter, 1985; Haritani *et al.*, 1989; Dowling *et al.*, 2004; López, 2007). Se revela una pleuritis fibrinosa, con los septos interlobulillares dilatados y conteniendo edema, fibrina, leucocitos y vasos linfáticos distendidos, los cuales pueden contener trombos. El epitelio bronquial puede encontrarse descamado y necrosado, sobre todo cuando *P. multocida* está presente. El lumen bronquial contiene restos celulares, leucocitos, fibrina y edema. En los alvéolos se encuentra abundante edema, fibrina, y en ocasiones eritrocitos; así como neutrófilos y macrófagos (Dungworth, 1985; Rehmtulla y Thomson, 1981). La morfología de los neutrófilos varía entre intactos a necróticos, exudado similar está presente en los alvéolos peribronquiales; los alvéolos más afectados se observan en las primeras fases de la infección. El carácter del exudado varía con el tiempo con lesiones agudas que tiene un porcentaje más alto de neutrófilos y un menor porcentaje de macrófagos en comparación con las lesiones crónicas.

Por lo general, una variable cantidad de hemorragia intraalveolar, y células de *P. multocida* se puede detectar en lúmenes alveolares y dentro de los neutrófilos y macrófagos, observando tanto bacterias degeneradas como intactas dentro de los fagosomas de los fagocitos (Haritani *et al.*, 1989), habiendo sido demostrado que *P. multocida* puede sobrevivir dentro de los fagocitos (Dowling *et al.*, 2004).

Es importante señalar que por lo general la infección por *P. multocida* produce una inflamación pulmonar de tipo supurativo (bronconeumonía) (Schiefer, 1978). En las secciones de tejido afectadas, se pueden detectar colonias bacterianas, sobre todo en las zonas más



afectadas por la inflamación. Es también posible observar trombos en vasos sanguíneos y linfáticos (Dungworth, 1985; Schiefer, 1978), los cuales pueden identificarse fácilmente con coloraciones especiales para fibrina. Además si existiese la participación de algún *Mycoplasma*, se aprecian prominentes infiltraciones de células mononucleares (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) en áreas peribronquiales, peribronquiolares y perivasculares, además del engrosamiento de paredes alveolares (Dungworth, 1985); sin embargo, dichas lesiones no son patognomónicas.

En infecciones experimentales al inocular *P. multocida* A: 3 en terneros se observaron lesiones pulmonares rojizas con congestión y hepatización en las regiones craneales que al corte contienen pus, adherencias pleurales prominentes, y cuando la dosis era elevada se formaban abscesos en las áreas afectadas (Ames *et al.*, 1984, Ishiguro *et al.*, 2005). Otros estudios revelan que los pulmones presenta neumonía purulenta con tendencia a la formación de abscesos y en los septos interlobulares hubo acumulación de neutrófilos y edema (Dowling *et al.*, 2004). Sin embargo, en otros casos se ha demostrado que se genera una neumonía fibrinosa, con áreas de necrosis coagulativa, abundante depósito de fibrina y una masiva dilatación y edema de los vasos linfáticos interlobulares y pleurales (Gourlay *et al.*, 1989). Otro estudio revela que al inocular *P. multocida* A: 3 y A: 12 en terneros, a los 4 días post infección se evidenció proliferación de los agregados de tejido linfoide peribronquial y peribronquiolar, severa alveolitis exudativa aguda, hemorragias focales a nivel alveolar, hiperemia de los capilares alveolares, de los septos interlobulares y de la pleura, así como distensión de los vasos linfáticos por linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos alveolares (Jericho y Carter, 1985).

#### 2.3.2.2 *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica*

Esta bacteria, al igual que *P. multocida*, se encuentran con relativa frecuencia como componente de la flora nasofaríngea de bovinos, ovinos (Frank, 1986) y alpacas (Calsín, 2008; Rosadio *et al.*, 2001).

*M. haemolytica* es uno de los principales agentes bacterianos que producen enfermedad respiratoria en bovino, formando parte del complejo respiratorio bovino, aunque no siempre este presente, siendo más probable hallarla como agente secundaria en infecciones virales (Rebhum, 1995). En ovinos es considerada la bacteria más frecuente generando cuadros de neumonías agudas, no obstante es también considerada una bacteria de la flora normal la cual con infecciones virales previas puede producir neumonía, como en las infecciones de PI-3 (Davies *et al.*, 1981)

En México, los estudios realizados en pulmones neumónicos de bovinos, indican también que esta bacteria se encuentra comúnmente involucrada en neumonías de becerros, vacas adultas y corderos (Trigo y Romero, 1986; Chávez *et al.*, 1985; Trigo *et al.*, 1979).

La primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica* (Biberstein, 1978; Merchant y Pecker, 1994). El conjunto de cepas negativas a la trealosa (biotipo A) de *Pasteurella haemolytica*, han sido recientemente reclasificadas a un nuevo género denominado *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1999).

*M. haemolytica* presenta características similares a las de *P. multocida*, diferenciándose en que *M. haemolytica* es negativo a la producción de indol, produce  $\beta$ -hemólisis en agar sangre, es lactosa positivo, crecen en agar McConkey formando colonias rojas parecidas a la cabeza de un alfiler (Quinn *et al.*, 2002); (Anexo 1).

En un trabajo realizado en los Estados Unidos, muestreando la cavidad nasal de ovinos, el serotipo A2 fue el más común (Frank, 1982), en Gran Bretaña y México las cepas de *M. haemolytica* aisladas de pulmones neumónicos de ovinos, indicó también que el serotipo A2 fue el más común (Thompson *et al.*, 1977; Colín *et al.*, 1987).

En lo referente a bovinos, los estudios realizados en Canadá y en los Estados Unidos coinciden en que el serotipo A1 es el más frecuentemente aislado de pulmones neumónicos y de cavidad nasal, seguido del serotipo A2 y serotipos no tipificables (Frank, 1986; Frank *et al.*, 1983).

Algunos serotipos de *M. haemolytica* forman parte de la microbiota normal de la cavidad nasofaríngea de los rumiantes, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonar del hospedador logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y causan daño al tejido pulmonar. En la presentación de la enfermedad intervienen diversos factores predisponentes, que son determinantes en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, las condiciones ambientales adversas y la mala alimentación de los animales puede favorecer al complejo respiratorio. También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral como adenovirus, virus respiratorio sincitial y parainfluenza tipo 3, y el virus de la rinotroqueitis infecciosa bovina son capaces de iniciar la enfermedad (Lea-Master *et al.*, 1987; Lopez *et al.*, 1982).

Las especies de *Mannheimia* pueden expresar una gran cantidad de potentes antígenos de superficie incluyendo lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias y polisacáridos capsulares. Estas bacterias secretan una citolisina específica para leucocitos denominada leucotoxina con capacidad antifagocítica y actividad citotóxica en leucocitos y plaquetas de los rumiantes (Leite *et al.*, 2003). La expresión de los diferentes antígenos ocurre en distintas condiciones de crecimiento, esto aumenta la posibilidad de que la expresión de antígenos puede estar alterada *in vivo* y contribuir a la patogénesis de la enfermedad, que aun no es muy bien conocida. Cada uno de estos antígenos probablemente contribuye a la enfermedad clínica, en combinación con las secreciones y componentes celulares que favorecen la presentación característica de la enfermedad así como los cambios histopatológicos asociados al proceso. Los mecanismos importantes en la inmunidad de los bovinos hacia *M. haemolytica*, están mediados por el complemento, la opsonización de la bacteria y la fagocitosis por neutrófilos (Weekley *et al.*, 1998).

Los animales que presentan signos clínicos eliminan las bacterias en las secreciones nasales, la transmisión puede producirse por la inhalación de las gotitas infectadas, exhaladas o tosidas por los animales enfermos (Radostis *et al.*, 2002).

En bovinos las lesiones macroscópicas más común es la neumonía lobar fibrinosa y/o necrotizante, donde las consolidaciones pulmonares presentes en la zona craneoventral pueden ser negro-rojizas o marrón- grisáceas, con pleuritis fibrinosa y áreas de necrosis. Las áreas necrosadas se muestran demarcadas con bordes gruesos, irregulares y blanquecinos con la zona central deprimida y de coloración rojiza. (Dungworth, 1985).

En corderos las lesiones se localizan en las regiones ventrales de los lóbulos apicales y cardiacos, evidenciando grados variables de consolidación, variando según el grado de la neumonía. En un principio de la infección los pulmones se muestran congestionados, cianóticos y pesados con escaso o casi nulo exudado seroso. En cuadros más severos la consolidación se muestra por los cambios de color del parénquima, así como de su consistencia tornándose firme y rígida, al corte exuda líquido hemorrágico espumoso, si la infección continua las zonas consolidadas pueden convertirse en áreas necrosadas, la mucosa se torna rojiza, o morado oscuro, y la espuma es rosada, observándose también el acumulo de fibrina en la pleura (Martin, 2000; Kimberling *et al.*, 1988).

La lesión microscópica más resaltante es la pleuritis fibrinosa, con trombosis generalizada de los vasos sanguíneos e intersticiales, y la necrosis coagulativa dentro de las áreas neumónicas.

Las lesiones iniciales suelen ser edema, extravasación de eritrocitos al espacio alveolar, fibrina, luego viene la participación de células inflamatorias neutrófilos, macrófagos (Radostis *et al.*, 2002). Los hallazgos microscópicos en corderos varían desde una bronconeumonía fibrino-purulenta, pasando por fibrinosa hasta fibrino- necrótica. Si los casos fueron agudos o hiperagudos la hemorragia es lo más notorio, hay presencia de edema, congestión y hemorragia capilar y exudado inflamatorio.

#### 2.3.2.3 Lipopolisacárido

Se sabe que el Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas incrementa la intensidad del daño pulmonar mediado por neutrófilos. Esto lo hace promoviendo la adhesividad de los neutrófilos al endotelio vascular, complementado con un aumento en la producción de radicales del oxígeno y liberación de enzimas lisosomales por el neutrófilo. Además, el LPS activa al complemento por las vías alterna y clásica, con lo cual se liberan factores quimiotácticos (C5a) para neutrófilos, exacerbando así la intensidad de la respuesta inflamatoria (Worthen, 1986).

LPS es el principal componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, lo que contribuye en gran medida a la integridad estructural de las bacterias, y la protección de la membrana de ciertos tipos de ataque químico. Se ha implicado al LPS en los aspectos no-patógenos de las bacterias, como adhesión a la superficie, la sensibilidad a los bacteriófagos, interacciones con los depredadores, tales como las amebas, además actúan como endotoxinas porque se une al complejo receptor CD14/TLR4/MD2, que promueve la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en muchos tipos celulares, pero sobre todo en macrófagos. (Stewart *et al.*, 2006)

EL LPS estimula la inmunidad humoral y es considerado como un antígeno protector. Estudios han demostrado que anticuerpos monoclonales contra el LPS de una cepa serotipo A de *P. multocida* en ratones es bactericida y protege a los ratones contra desafíos homólogos (Wijewardana *et al.*, 1990). Además, un anticuerpo monoclonal contra el lipopolisacárido opsonico de una cepa del serotipo B protege parcialmente ratones contra la infección por *P. multocida* (Ramdani y Adler, 1991).

El lipopolisacárido de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas es un complejo lipídico compuesto por tres regiones: lípido A, antígeno O, polisacárido del núcleo. (Jawets, 2002) (Figura 1).

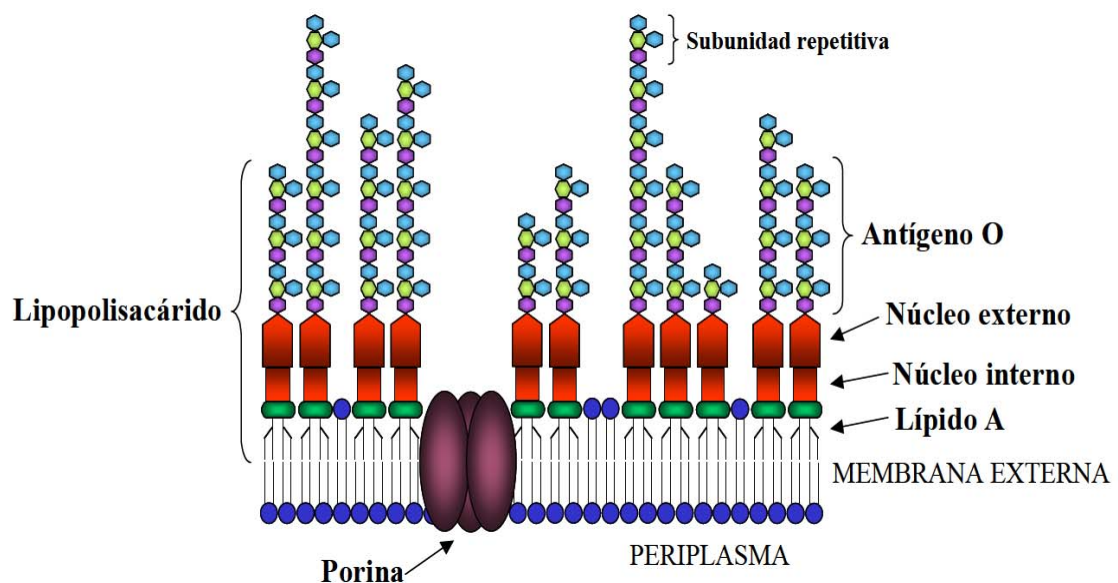


Fig.1: Estructura del LPS

El lípido A es responsable de la toxicidad de las bacterias Gram negativas. Cuando la bacteria es lisada por el sistema inmune, los fragmentos de la membrana que contienen al lípido A son liberados dentro de la circulación, causando fiebre, diarrea y un posible shock endotóxico (shock séptico) (Jawets, 2002).

La proteína del núcleo está unido al lípido A, este es un oligosacárido heterogéneo sin unidades de repetición unido al lípido A en la posición 6' mediante un residuo de Kdo, que, a su vez, se divide en núcleo interno y núcleo externo (Caroff y Karibian, 2003). El núcleo del LPS está implicado de forma indirecta en la virulencia al ser el lugar de anclaje del antígeno O, aunque también se ha descrito una posible relación con la adhesión de ciertas bacterias a células del hospedador (Jacques, 1996).

El antígeno O es la parte más externa, inmunogénica y variable del LPS. Es uno de los componentes de la bacteria que está sometido a una mayor presión selectiva, ya que actúa como receptor para bacteriófagos y es también importante en la respuesta inmune del hospedador, quedando reflejada en la elevada variabilidad estructural que presenta tanto a nivel de la naturaleza, como en el orden y en los enlaces de los diferentes azúcares que lo constituyen. Se trata de un importante factor de virulencia que proporciona a la bacteria una capa superficial hidrófila que puede enmascarar importantes epítomos antigénicos conservados de la membrana externa y que es capaz de conferir resistencia a la actividad bactericida del complemento, en

función de la cantidad de moléculas de LPS con antígeno O, así como de la longitud de esta cadena polisacáridica. Por otro lado, también se ha descrito, en muchas bacterias patógenas, el papel que juega como adhesina y, consecuentemente, su importancia en la colonización de las mucosas del organismo hospedador (Merino *et al.*, 1996).

El antígeno O es un polímero con repeticiones de glicanos dentro de un LPS, el antígeno O se adjunta al oligosacárido del núcleo, y cuenta con el dominio exterior de la molécula de LPS. La composición de la cadena O varía de cepa a cepa. Por ejemplo, hay más de 160 estructuras diferentes de antígeno O producidos por diferentes cepas de *E. coli* (Raetz y Whitfie, 2002).

### 2.3.3 Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV)

Virus respiratorio sincitial bovino se detectó por primera vez en Japón, Bélgica y Suiza en 1967, y se aisló pronto después en Inglaterra y los Estados Unidos. Ahora se sabe que afecta a todas las especies bovinas, así como en el ganado ovino, cabras y otros ungulados (Maclachlan *et al.*, 2011).

EL BRSV pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, la cual posee el genoma formado por una cadena única de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa (no segmentado), que se encuentra en el interior de una nucleocápside helicoidal, que hace al ARN resistente a la digestión con ribonucleasas (RNAsa), y que contiene la polimerasa viral; su ciclo viral replicativo es citoplasmático; los viriones adquieren una envoltura lipídica que procede de la membrana plasmática y la entrada en la célula huésped está mediada por fusión de las membranas viral y celular (Collins *et al.*, 2001).

La familia *Paramyxoviridae* contiene a su vez dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*, este último posee dos géneros, el Metapneumovirus y Pneumovirus, el género Pneumovirus está representado por el virus respiratorio sincitial humano (HRSV), así como virus sincitiales del Bovino, Ovino y Caprino (Collins *et al.*, 2001).

Los pneumovirus se distinguen de los paramixovirus en que su nucleocápside tiene un diámetro menor, codifica entre 8 y 10 ARNm en comparación con los 6-7 de otros paramixovirus, por lo que la organización genómica es más compleja, y por la presencia de la glicoproteína G, que media la unión al receptor y carece de actividad de hemaglutinina y neuraminidasa (Collins y Mottet, 1991).

Las partículas virales, están constituidas por una nucleocápside helicoidal cubierta de una envoltura lipoproteica, que el virus adquiere al salir de la célula por gemación. Esta envoltura contiene tres glicoproteínas transmembranales, la proteína de unión al receptor o glicoproteína G, la proteína de fusión o glicoproteína F, y una proteína pequeña hidrofóbica o proteína SH. La proteína matriz (M), forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales, que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco separadas entre sí (6-10 nm). La nucleocápside es una hélice simétrica en la que está el ácido ribonucleico viral (ARNv) asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L) (Collins *et al.*, 2001).

La glicoproteína F media la unión a las células y es responsable de la penetración del virus en la célula por fusión de sus membranas, permitiendo la entrada de la nucleocápside en el citoplasma de la célula huésped (Srinivasakumar *et al.*, 1991) (Figura 2). Es una glicoproteína tipo I, que se inserta en la membrana por la región hidrofóbica C-terminal. Así mismo, la glicoproteína F, media la fusión de la membrana de la célula infectada con las células adyacentes, dando lugar a la propagación del virus y a la formación de sincitios o células gigantes multinucleadas. La proteína F induce anticuerpos neutralizantes y confiere resistencia a la infección BRSV (Walsh y Hruska, 1983, Taylor *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2005). Esta proteína se sintetiza como un precursor inactivo F0, el mismo es procesado proteolíticamente por una proteasa celular, dando lugar a dos subunidades F1 y F2 que quedan unidas covalentemente por puentes disulfuro, antes de alcanzar la superficie celular (Collins *et al.*, 2001).

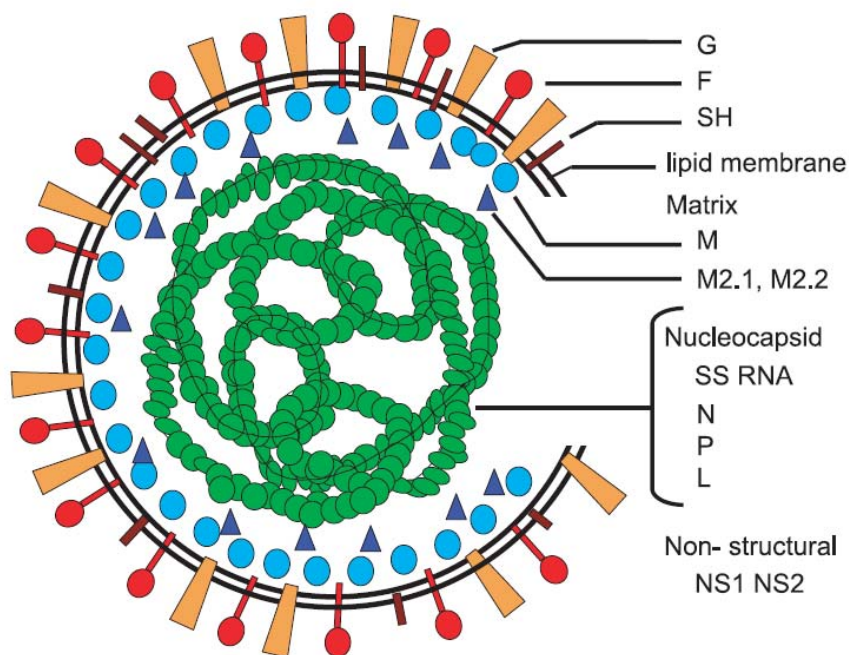


Fig. 2: Diagrama del Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV). Tomado de Valarcher y Taylor, 2007.

BRSV está estrechamente relacionado con el HRSV mostrando características clínicas, patológicas y epidemiológicas comunes, su composición proteica es similar y pueden dar reacciones antigénicas cruzadas (Valentova, 2003; Viuff *et al.*, 2002), a esto se suma que a diferencia de HRSV, que usualmente es el único agente causal de la enfermedad, la infección por BRSV frecuentemente se acompaña de infección bacteriana concomitante formando el complejo respiratorio bovino (Easton *et al.*, 2004). Algunos anticuerpos monoclonales desarrollados para detectar el virus humano también detectará el equivalente de la especie bovina. Cepas de virus respiratorio sincitial de ovinos y caprinos también son reconocidos, y estos quizás representen, juntos con el BRSV un subgrupo de virus sincitiales de rumiantes en lugar de especies diferentes (Maclachlan *et al.*, 2011).

El virus se propaga rápidamente, probablemente a través de aerosoles o las gotitas de las secreciones de las vías respiratorias. La replicación se inicia en el tracto respiratorio alto e incluye el epitelio nasal, traqueal y bronquial (Viuff *et al.*, 2002), generando cuadros de bronquitis y bronquiolitis catarral caracterizado por la destrucción del aparato mucociliar, necrosis e hiperplasia de las células epiteliales (Masot *et al.*, 1996). Como consecuencia se ve mermada la eficiencia de la limpieza mucociliar favoreciendo el desarrollo de bronconeumonías secundarias, sin embargo, cuando la replicación se restringe en el tracto respiratorio alto, los



signos clínicos que se producen son moderados. El mecanismo por el cual el virus se disemina por el tracto respiratorio bajo no está muy claro, pero se presume que se disemina de manera directa a lo largo del epitelio y a su vez a través de la aspiración de las secreciones nasofaríngeas, otro posible mecanismo de diseminación es a través de la infección de macrófagos que migran hacia las zonas bajas del tracto respiratorio (Domachoswske y Rosenberg, 1999).

La reinfección es común en las crías con anticuerpos pre-existentes ya sea por transferencia pasiva o por una infección previa o vacunación, lo cual no impide la replicación del virus y la excreción, aunque los signos clínicos pueden ser disminuidos. El virus persiste en los rebaños, más probablemente a través de continuas reinfecciones subclínicas o en portadores del virus supuestamente inaparente. La enfermedad causada por la infección de virus respiratorio sincitial es particularmente importante en terneros recién destetados y el ganado joven, sobre todo cuando se mantienen en estrecha confinados condiciones. La infección se caracteriza por una súbita aparición de fiebre alta, hiperpnea, respiración abdominal, letargo, rinitis, secreción nasal y tos (Maclachlan *et al.*, 2011).

La neumonía bacteriana secundaria, especialmente la causada por *Mannheimia haemolytica*, es común. Los brotes a menudo ocurren después de una fuerte caída en la temperatura (Maclachlan *et al.*, 2011). Pero otros reportes indican la interacción de este virus con otros agentes virales como PI-3, BCV, BAV-3, BAV-7, que están asociados a infecciones bacterianas con *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma dispa*, sin la presencia de *Mycoplasma bovis* y *Mannheimia haemolytica* en los aislados bacterianos (Hartel *et al.*, 2004).

En muchos lugares el virus de la especie bovina causa inaparente infecciones, pero en pocos terneros destetados y bovinos jóvenes puede causar neumonía, edema pulmonar y enfisema. La infección también predispone a otras infecciones de la las vías respiratorias. La infección por el virus se presenta más a menudo durante los meses de invierno cuando el ganado, se encuentran en condiciones de confinamiento. Sin embargo, hay reportes de brotes importantes en los rebaños de vacas y terneros en verano (Maclachlan *et al.*, 2011).

Los hallazgos macroscópicos muestran que las áreas de la región craneoventral se consolidan, al igual que los lóbulos cardiacos y las porciones craneales de los lóbulos diafragmáticos, puede existir descarga mucopurulenta en la zona bronquial si existe neumonía bacteriana secundaria (Peixoto *et al.*, 2000). Las zonas dorso caudales de los pulmones se hallan dilatadas debido al enfisema (Bryson, 1993). Los ganglios linfáticos pueden estar aumentados de

tamaño, edematosos y hemorrágicos. Si existiese una infección bacteriana, el parénquima pulmonar se hayan consolidado y se observa depósitos de fibrina, así como cuadros de bronconeumonía supurativa (Valarcher y Taylor, 2007).

Los hallazgos microscópicos se caracterizan por presentar una bronquiolitis proliferativa y exudativa, con enfisema e infiltración de células mononucleares (Thomas *et al.*, 1984). Se observa necrosis del epitelio y apoptosis de las células epiteliales, los sincitios están presentes libres en el lumen de los bronquios o en el epitelio o la luz alveolar. La luz de los bronquios, bronquiolos y alvéolos se han obstruido por restos celulares que consiste en su mayor parte de los neutrófilos, células epiteliales descamadas, macrófagos y a veces, eosinófilos (Viuff *et al.*, 2002).

En los procesos neumónicos en los cuales se producen infecciones virales previas, como en el caso de PI-3 y BRSV, ambos agentes pueden producir daño del aparato ciliar y disminuir la producción de moco, incluso afectar el epitelio del tracto respiratorio superior, pudiendo producir desprendimiento de las células epiteliales produciendo degeneración y necrosis, con lo cual favorece la colonización bacteriana del tracto respiratorio superior (Masot *et al.*, 1996; Tsai y Thomson, 1975). Permitiendo el fácil acceso de las bacterias al tracto respiratorio inferior, colonizando los pulmones y generando los cuadros neumónicos mixtos. En los becerros infectados experimentalmente, el virus causa la destrucción del epitelio ciliado de las vías respiratorias en el pulmón, lo que predispone las infecciones bacterianas secundarias (Maclachlan *et al.*, 2011).

## 2.4 Sistema Inmune

### 2.4.1 Respuesta Innata

El sistema inmune en mamíferos consiste en una respuesta innata y una adaptativa. La inmunidad adaptativa es mediada por la respuesta específica de las células B y T al antígeno y es observado solo en vertebrados. La inmunidad innata, sin embargo, es conservada entre invertebrados y vertebrados. (Takaeda y Akira, 2001).

Aunque útiles, las barreras físicas no son del todo eficaces por sí solas, ya que con el tiempo y la persistencia suficientes, el invasor llega a vencer los obstáculos físicos. De este modo, la

primera línea de defensa consiste en los mecanismos químicos y celulares conocidos como sistema inmunitario innato. (Tizard, 2002).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa, cuyos elementos están codificados por el ADN y no expresado por las células clonales después de la exposición antigénica, como en el caso de la inmunidad adaptativa. El sistema inmune innato destruye muchos patógenos, determina la localización y la magnitud del desafío, y facilita la adaptación respuesta inmune. La inmunidad innata es mediada por los genes que se mantienen en la línea germinal y codifican para proteínas que reconocen patrones estructurales conservados en microorganismos. Defensinas y otros péptidos antimicrobianos, complemento, opsoninas, así como receptores de transducción de señal y de endocitosis y las proteínas solubles que se unen y aglutinan a los microorganismos son los componentes del sistema inmunitario innato. (Janeway y Medzhitov 1998, Zhang y Ghosh 2001, Hallman *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's)

Los componentes específicos de las paredes de las células microbianas son fuertes activadores de la respuesta inmune innata. Estas moléculas se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP's). Todos ellos son esenciales, conservados componentes microbianos que son reconocidas como extraños por receptores específicos de reconocimiento de patrones (PRR's). PRR's se expresa preferentemente en monocitos y macrófagos y en otros tipos celulares también. Los receptores pueden ser estructuralmente divididos en aquellos que contienen un LRR (repetición rica en leucina) de dominio, un dominio de lecitina calcio dependiente, o un dominio de la proteína del receptor scavenger (Medzhitov y Janeway, 1997b).

Los receptores secretados suelen activar la cascada del complemento, receptores endocíticos mueven el patógeno de la superficie del fagocito en sus lisosomas intracelulares para su destrucción, y los receptores de señalización inducen la expresión de una variedad de productos de la reacción de fase aguda. En los mamíferos, los PMAP's activan la producción de, por ejemplo, los lípidos bioactivos (como el factor activador de plaquetas), las especies de oxígeno reducido (NO), las proteínas, como las citocinas (IL) -1, IL-6, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), ya que todos son importantes en la respuesta a la infección (Janeway y Medzhitov 1998; Zhang y Ghosh 200; Hallman *et al.*, 2001).

Los TLR's como otros receptores de reconocimiento de patrón, reconoce los llamados PAMP's, los cuales son motivos conservados, que son únicos de microorganismos y son esenciales para su metabolismo y su supervivencia. Estos tienen tres ventajas principales. En primer lugar, los PAMP's son producidos solo por microorganismos y no por las células huésped, permitiendo al sistema inmune la distinción entre lo propio y lo ajeno. Segundo, como los PAMP's son esenciales para la supervivencia microbiana, las mutaciones o la pérdida de los patrones puede ser letal, para ello estos patrones no son sujetos a las altas tasas de mutaciones. Y tercero, los PAMP's son invariantes entre los microorganismos de una clase dada, lo que implican que no solo a un número limitado de gérmenes de la línea codificada de los receptores de reconocimiento de patrón necesitan para su detección de la presencia de infección microbiana (Medzhitov y Janeway, 1997b)

#### 2.4.3 Toll Like Receptor's (TLR's)

El primer miembro de la familia de TLR identificado fue la proteína Toll, que se caracterizó por primera vez en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* en las investigaciones sobre las bases moleculares de la especificación de los ejes embrionarios del cuerpo o patrón dorsoventral (Anderson *et al.*, 1985; Morisato y Anderson, 1995; Hashimoto *et al.*, 1988).

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores transmembrana de tipo 1 que presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de la IL-1 (IL-1r). (Mesa-Villanueva y Patiño, 2006). Esta similitud se da en el dominio intracelular de la proteína Toll, la cual muestra una notable similitud con los dominios intracelulares del receptor de la interleucina-1 (IL-1) de los mamíferos (Gay y Keith, 1991), así como con su participación en la respuesta inmune de la mosca adulta. (Lemaitre *et al.*, 1996)

Diferentes homólogos humanos del Toll fueron identificados y mostraron que inducen a la activación del factor de transcripción nuclear – B (NF-κB) a la sobreexpresión, revelando que los TLR's y el receptor de IL-1 desencadenan similar vía de transducción de señales (Medzhitov *et al.*, 1997a; Rock *et al.*, 1998).

El primer receptor Toll-like caracterizado en mamíferos (Citado en primer lugar hToll y para luego llamarse TLR4) fue encontrado en 1997 por Charles Janeway *et al.* (Medzhitov *et al.*, 1997b). Desde entonces, al menos diez TLR han sido identificados en mamíferos, once en ratones (Rock *et al.*, 1998; Chaudhary *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999b; Sebastiani *et al.*,

2000; Chuang y Ulevitch 2000; Du *et al.*, 2000, Chuang y Ulevitch 2001; Menzies e Ingham, 2006).

Los TLR's no parecen tener una función de desarrollo, pero han demostrado que juegan un papel central en el sistema inmune de los mamíferos. Están involucrados en las enfermedades infecciosas a través del reconocimiento de diversos productos microbianos y mediante la activación de cascadas de señalización. La activación inadecuada puede dar lugar a fallos sépticos multiorgánicos, incluyendo el daño pulmonar, insuficiencia cardíaca y daño cerebral (Fenton y Golenbock 1998; Knuefermann *et al.*, 2002; Hagberg *et al.*, 2002).

Además, los TLR's son capaces de reaccionar con antígenos del medio ambiente e incluso antígenos propios y por lo tanto pueden contribuir a la generación de varias enfermedades no infecciosas, como alergias o enfermedades autoinmunes. TLR se consideran también receptores de "vigilancia", lo que indica que son capaces de vigilar los tejidos para los estados de la enfermedad (Johnson *et al.*, 2003).

TLR's de mamíferos son receptores de reconocimiento de patrones que funcionan como un cluster de diferenciación (CD) -14 asociados a transductores de señales, ayudan a las células para reconocer y distinguir entre los patógenos, y entablar las cascadas de señalización. También contribuyen a reducir la inmunidad innata y adaptativa mediante la inducción de varios co-estimulantes y moléculas efectoras (Zhang y Ghosh, 2001). Sin embargo, es poco probable que el TLR tenga una función de desarrollo en los mamíferos, ya que el factor de diferenciación mieloide (MyD)-88, un socio cercano estructural y funcional de TLR de mamíferos, no muestra ninguna función en el desarrollo embrionario.

Todos los TLR's comparten la misma estructura: un gran dominio extracelular (550 a 980 aminoácidos) que consiste en repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un TIR (como Toll/IL-1R-) dominio citoplasmático de unos 200 aminoácidos de longitud. El dominio extracelular tiene la capacidad de unión al ligando, y el dominio TIR media la señal. Las regiones TIR también se han encontrado en el virus vaccinia, y son utilizados por el virus de acogida para suprimir la IL-1 y de señalización TLR (Bowie *et al.*, 2000). A pesar de estas similitudes, TLR son expresados diferencialmente y regulado en muchos tejidos y tipos de células. Los tipos celulares en los que expresan los TLR's son: mastocitos, macrófagos queratinocitos, linfocitos (Muzio *et al.*, 2000b; Zarembek y Godowski 2002; Bottcher *et al.*, 2003).

Los ligandos de muchos TLR se han caracterizado (Figura3); TLR4 interviene en la inmunidad innata en respuesta al LPS, a la proteína F del RSV (Kurt-Jones *et al.*, 2000), reconoce los viriones del Cocksackievirus B4 (Triantafilou y Triantafilou, 2004), y las proteínas de desarrollo del Virus del Tumor Mamario Murino y del virus de la leucemia Murina (Rassa *et al.*, 2002; Burzyn *et al.*, 2004) así como ligandos de plantas y levaduras, TLR2 se ha demostrado que median la respuesta frente a levaduras y bacterias grampositivas (Lien *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 1999a), TLR1 funciona como proteína accesoria (Wyllie *et al.*, 2000), TLR3 reconoce ARN viral de doble cadena (Alexopoulou *et al.* 2001, Doyle *et al.* 2003), TLR5 se activa por la flagelina bacteriana (Hayashi *et al.*, 2001; Szabo, 2003), funciones de TLR6 para ayudar a TLR2 (Takeuchi *et al.*, 2001; Bulut *et al.*, 2001), y TLR9 responde a motivos dinucleótido CpG no metilados (Hemmi *et al.*, 2000), TLR 11 responde a la profilina del *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky *et al.*, 2005).

Hay una cierta falta de distinción entre los ligandos del TLR4 y TLR2, y por lo tanto parece muy posible que algunos de los TLR pueden sustituirse unos por otros en determinadas circunstancias. TLR tienen la capacidad de oligomerizan en sus dominios citoplasmáticos. Parece que sus colas citoplasmáticas no son funcionalmente equivalentes, pero algunos requieren el montaje TLR en complejos heteroméricos, mientras que otros operan como homoméricos (Ozinsky *et al.*, 2000). TLR4 actúa como un homodímero, y un estudio reciente también ha implicado la formación de un heterodímero TLR5/TLR4 en la señalización de flagelina bacteriana (Mizel *et al.*, 2003). TLR2 pueden formar parejas y funcional con TLR6 y TLR1, pero también funciona solo (Ozinsky *et al.*, 2000).

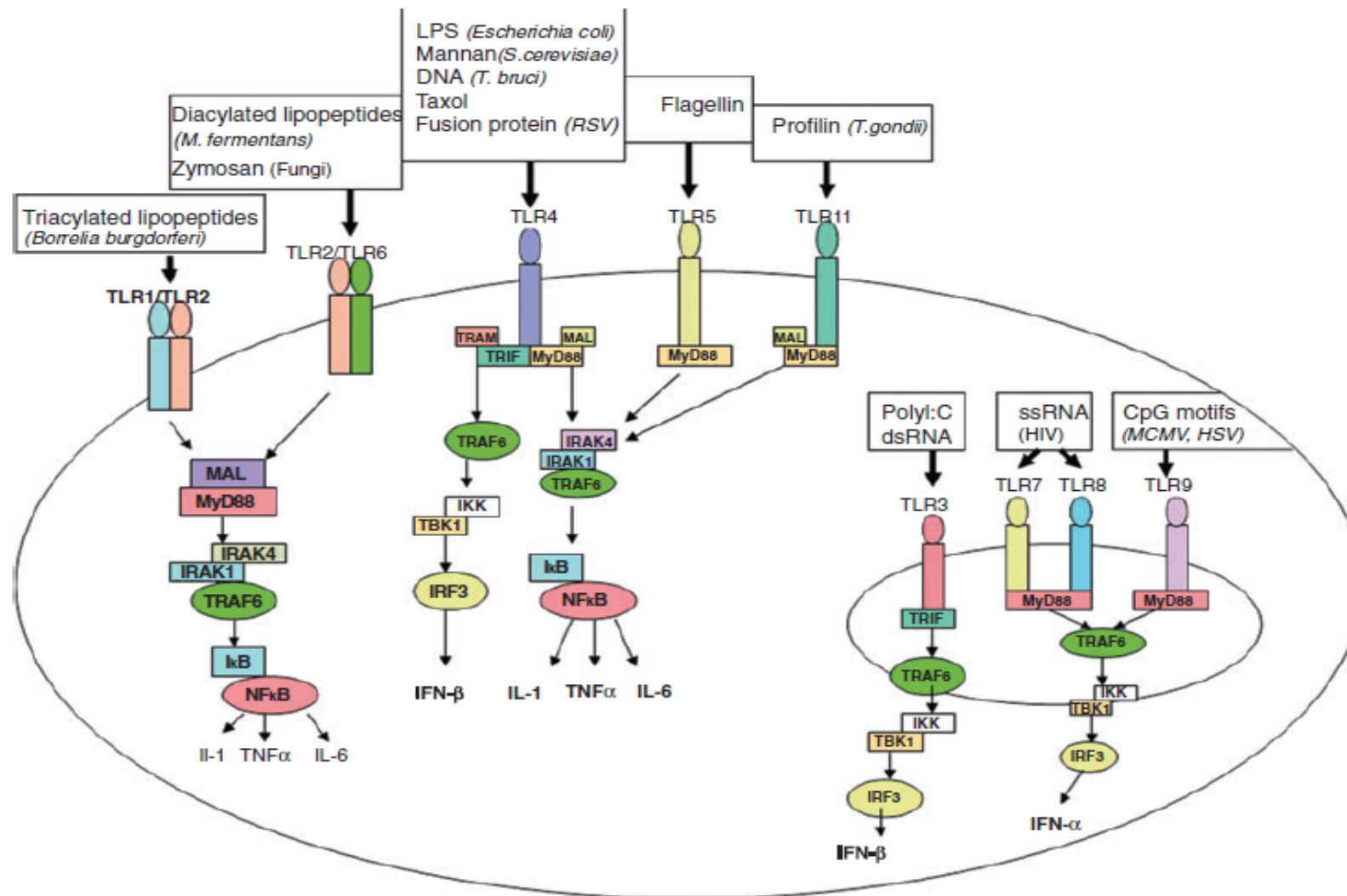


Fig. 3: TLR's y los diferentes ligandos con los que interactúan. Vista general del inicio de las respuestas proinflamatorias y antivirales por los TLR's, los cuales utilizan diferentes tipos de proteínas adaptadoras para dar inicio a los factores de transcripción. (Modificado de Carpenter y O'Neill., 2007)

#### 2.4.4 Infecciones Pulmonares y TLR's

En el pulmón, los macrófagos alveolares y células epiteliales constituyen la primera línea de defensa del hospedero contra la habilidad de los microorganismos invasores a través de los diferentes tipos de receptores, especialmente los receptores recientemente descritos de la familia de receptores tipo Toll (Takeda *et al.*, 2003; Basu y Fenton, 2004).

El examen detallado de los genomas de humanos y ratones revela que existe no más de 10 TLR diferentes. Estos receptores reconocen varios microorganismos derivados de patrones moleculares. Estudios previos se enfocaron en el rol del TLR2 y TLR4 que son los principales receptores involucrados en el reconocimiento de varios componentes de la pared celular de bacterias. El TLR 4 es crucial para la respuesta efectiva contra el LPS de las Gram-negativas (Chow *et al.*, 1999).

Todos aparecen como receptores clave para el sistema inmune innato como para la iniciación y activación de la cascada de señalización la cual está envuelta con las moléculas adaptadoras MyD88 (excepto el TLR 3), dirigiendo el NF- $\kappa$ B de translocación nuclear e inducción de diferentes genes proinflamatorios (Takeda *et al.*, 2003; Basu y Fenton, 2004).

Por lo tanto, los TLR's aparecen directamente involucrados en la defensa contra las infecciones. Por ejemplo, la deficiencia de TLR2 en ratones muestra alta susceptibilidad contra el tipo de infecciones salvajes en ratones por bacterias gram-psositivas como el *Staphylococcus aureus* (Takeuchi *et al.*, 2000) Mas importante aún, ha sido reportado que la mutación del *tlr2* puede predisponer a los humanos a llegar a tener tratamientos de por vida por infecciones causados por *Staphylococcus*. (Lorenz *et al.*, 2000).

Otras investigaciones que estudiaron el rol del TLR4 en la defensa del hospedero contra las infecciones del tracto respiratorio por bacterias Gram-negativas in vivo, revelan que el TLR4 contribuye a la protección de la respuesta inmune innata contra el *Haemophilus influenzae* (Wang *et al.*, 2002) y *Klebsiella pneumoniae* (Branger *et al.*, 2004), además de proteger al hospedero frente a infecciones virales causadas por Virus respiratorio sincitial (RSV) (Kurt-Jones *et al.*, 2000, Valarcher y Taylor, 2007).



#### 2.4.5 TLR4

##### 2.4.5.1 Estructura

TLR4 se ha localizado en el cromosoma 4 en el ratón (Poltorak *et al.*, 1998b) y cromosoma 9q32-33 en humanos al (Rock *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la expresión es monoalélica en los granulocitos de médula ósea y células B esplénicas (Pereira *et al.*, 2003). El gen TLR4 de ratón y humano ha sido clonado y secuenciado (Smirnova *et al.*, 2000). El gen humano es de 19 kb de longitud y consta de tres exones. El promotor de análisis ha demostrado que la ubicación de aproximadamente 75 pb más arriba desde el punto de inicio de la transcripción, siendo suficiente para dirigir la expresión de genes. Esta región promotora está altamente conservada entre el ser humano y el ratón. El tamaño del gen de ratón es 91,7 kb, su longitud se debe a las secuencias intrónicas; de lo contrario, es estructuralmente similar al gen humano (Smirnova *et al.*, 2000).

El dominio extracelular de la proteína TLR4 contiene 22 copias de LRR (Rock *et al.*, 1998). La parte extracelular de TLR4 contiene 9 sitios N-glicosilación. La glicosilación es importante para el transporte de la proteína a la superficie celular y el mantenimiento de los requisitos funcionales de la integridad del complejo receptor de LPS (da Silva *et al.*, 2002). La señal que medie parte de TLR4 es el dominio intracelular TIR (Rock *et al.*, 1998).

##### 2.4.5.2 Ligando y Función

Además de mediar la producción de citocinas en respuesta al LPS y de algunos otros productos bacterianos y virales, el TLR4 ha sido sugerido como un receptor para algunos ligandos endógenos y, por lo tanto, a participar en otros fenómenos centrales en la respuesta inmune. Por ejemplo, el TLR4 reconoce factores virales, como la proteína de Fusión (F) del RSV (Kurt-Jones *et al.*, 2000, Valarcher y Taylor, 2007). Además se conoce que el TLR4 estimula la secreción de quimioquinas, fibrinógeno, macrófagos (Smiley *et al.*, 2001). La fibronectina, que se produce en las células en respuesta a lesión de los tejidos, activa TLR4 (Okamura *et al.*, 2001). Proteínas de shock térmico 60 (hsp60) induce una respuesta proinflamatoria a través de TLR4 como una señal de peligro del estrés y las células dañadas (Ohashi *et al.*, 2000). Además, el TLR4 controla la migración de polimorfonucleares mediante el control de receptores de quimiocinas de células superficiales (Fan y Malik, 2003). Así mismo la proteína pulmonar surfactante A estimula la expresión de TLR4 (Guillot *et al.*, 2002).

#### 2.4.5.3 Cascada de Señalización

La cascada de señalización del TLR en mamíferos es análoga a la vía de señalización de la proteína Toll de *Drosophila*. En la *Drosophila melanogaster*, un producto proteolíticamente procesado del gen Spätzle activa el receptor Toll. Las señales de activación Toll a través del Tubo (corresponde con MyD88 en los mamíferos) y los Pelle-quinasa serina-treonina (IRAK en los mamíferos) para Cactus, que es el análogo del inhibidor de NF- $\kappa$ B en mamíferos. La degradación de los Cactus comunicados de dorsal, es decir, como la proteína NF- $\kappa$ B, desde el complejo se transloca dorsal en el núcleo, donde activa genes específicos apropiados, como el péptido antifúngico Drosomycin y péptido antibacteriano Attacin (Anderson, 2000). El gen Spätzle necesita ser procesada por la proteasa de serina para activar los receptores Toll, y se ha sugerido que el LPS primero puede activar la serina proteasa de mamíferos, que genera un producto que se requiere para seguir la señalización, pero no hay pruebas directas para el argumento (Mansell *et al.*, 2001).

De acuerdo a los actuales conocimientos, LPS se reconoce primero cerca de la superficie de las células por la LBP, los que rompen agregados de LPS y mueven monómeros de LPS a la proteína de membrana CD14. LBP tiene un sitio de alta afinidad de unión al LPS, y funciona como un catalizador de lípidos de transferencia proteína (Schumann *et al.*, 1990, Tobias *et al.*, 1995, Su *et al.*, 2000). El dominio extracelular de CD14 es muy similar al dominio extracelular de TLR4, pero como carece de dominio citoplasmático, no es capaz de inducir la señalización celular (Medzhitov *et al.*, 1997). MD-2 es físicamente asociado al TLR4 y esencial para que TLR4 se traslade en la superficie celular (Ohnishi *et al.*, 2003) y para que se desarrolle una respuesta eficaz frente al LPS (Shimazu *et al.*, 1999, Akashi *et al.*, 2000, Akashi *et al.*, 2001, Visintin *et al.*, 2001, Schromm *et al.*, 2001, Mancek *et al.*, 2002). Se ha demostrado que LPS está en contacto directo con cada uno de los otros tres miembros del complejo receptor (da Silva *et al.*, 2001) (Figura 4).

El efecto corriente abajo de TLR4 es una proteína adaptadora MyD88, que interactúa con el receptor transmembrana a través del dominio TIR C-terminal (Lord *et al.*, 1990, Hultmark 1994, Medzhitov *et al.*, 1998). MyD88 une Ser / Thr quinasa IRAK (IL-1R asociado a quinasa) para el complejo receptor (Wesche *et al.*, 1997). IRAK está asociado con un adaptador al receptor TNF asociado al factor 6 (TRAF6) (Cao *et al.*, 1996a, Cao *et al.*, 1996b, Muzio *et al.*, 1997). TRAF6, a su vez, activa el MAP3K miembro de la familia NIK (NF- $\kappa$ B que inducen quinasa) (Malinin *et al.*, 1997), que activa la NF- $\kappa$ B inhibidor de quinasas (IKKS) (Ling *et al.*, 1998, Takeda *et*

*al.*, 1999, Hu *et al.*, 1999, Li *et al.*, 1999). La degradación de NF- $\kappa$ B permite la posterior translocación al núcleo para activar e inducir la expresión de genes apropiados (Mercurio *et al.*, 1997, Woronicz *et al.*, 1997, Zandi *et al.*, 1997).

Los mecanismo a nivel molecular indican que el BRSV induce la activación del NF- $\kappa$ B e inicia la respuesta inmune a través de la interacción de la proteína F y el TLR 4 (Kurt-Jones *et al.*, 2000), y por la interacción del dsRNA con el TLR3 (Rudd *et al.*, 2005) (Figura 5). Aunque el TLR4 es expresado en altos niveles por los macrófagos y células dendríticas, es expresado a su vez en bajos niveles por las células del epitelio respiratorio. Sin embargo, la infección por HRSV incrementa los niveles de expresión de tlr4 en estas células y aumenta su respuesta al LPS (Monick *et al.*, 2003). La cascada de señalización es similar a la que se da por la unión del LPS al CD14 y al Tlr4 (Kurt-Jones *et al.*, 2000).

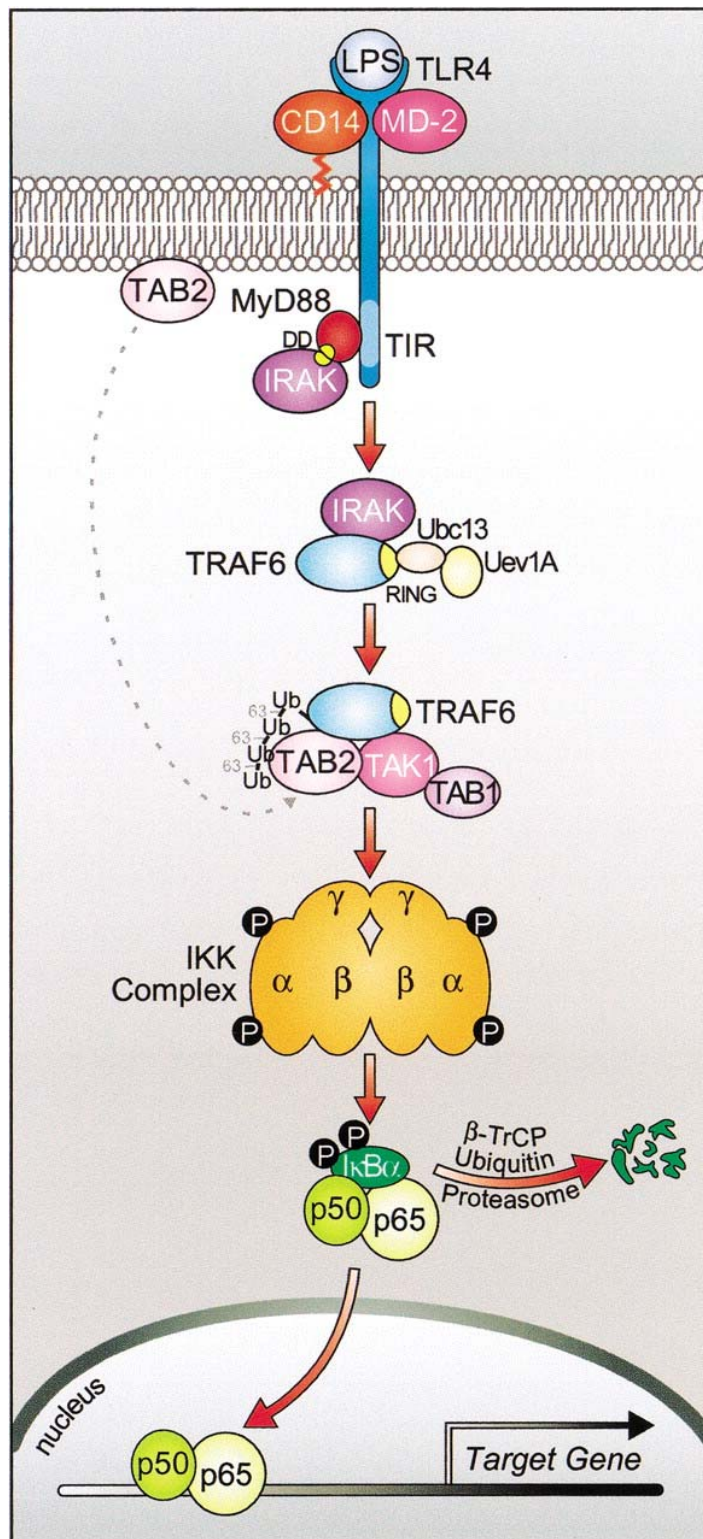


Fig.4: Cascada de señalización del TLR4, cuando el receptor es estimulado por LPS (Tomado de Silverman y Maniatis, 2001)

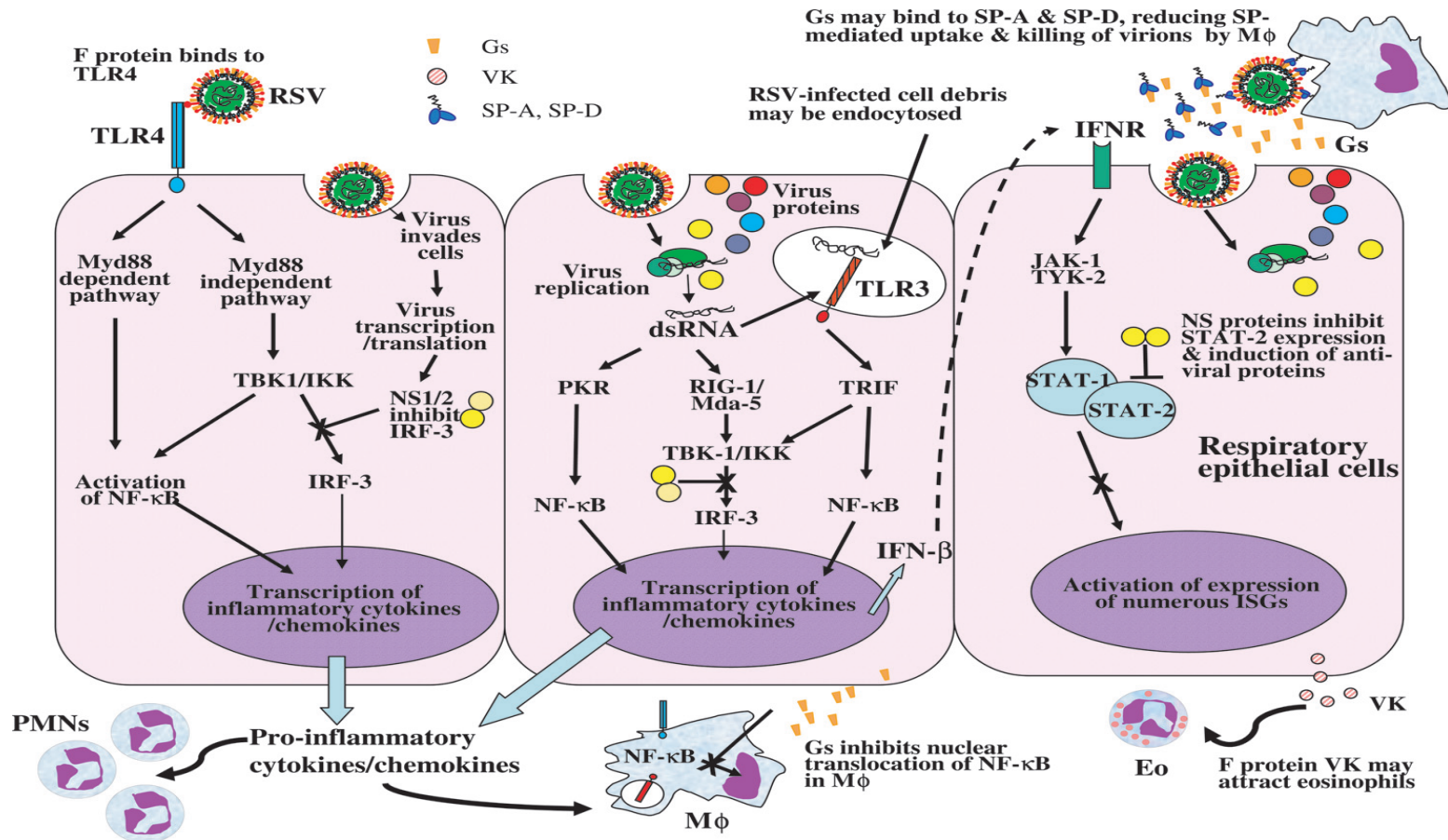


Fig.5: Cascada de señalización del TLR4 y mecanismo molecular cuando el receptor es estimulado por la Proteína F del RSV, obsérvese el primer diagrama de la célula de la derecha. El RSV se adhiere a las células epiteliales respiratorias a través de glicosaminoglicanos y posiblemente otros receptores. La interacción de la proteína F con TLR4 conduce a la activación de NF-κB a través de la vía dependiente e independiente del Myd88, para la transcripción de citoquinas (Tomado de Valarcher y Taylor, 2007).

#### 2.4.5.4 Alteración de la expresión del gen *tlr4*

TLR 4 fue descubierto como el principal mediador de la respuesta de LPS por la caracterización de la hiporespuesta al LPS por cepas de ratones. Por medio de estudios que demostraron que la cepa de ratón C3H/HeJ y C57BL/10ScCr muestran una respuesta deficiente a las endotoxinas bacterianas. (Sultzter 1968, Coutinho *et al.*, 1977). Ellos pudieron tolerar enormes cantidades de LPS sin efecto letal, pero eran muy susceptibles a infecciones de bacterias Gram negativas. Estudios genéticos revelaron un solo el locus LPS en el cromosoma 4, el cual es responsable de la hiporespuesta al LPS. Posteriormente este locus fue mapeado (asignado) como el gen *tlr4* (Poltorak *et al.*, 1998a, Poltorak *et al.*, 1998b, Qureshi *et al.*, 1999).

Los animales desarrollan normalmente de otra manera, pero no muestran respuesta al LPS o al Lípido A sintético a un cierto nivel de dosis. La hiporespuesta fue tardíamente sugerida para debido a la interrupción de la vía de señalización mediada por TLR4 resultando de la inhabilidad del mutante de TLR4 a la interacción con el segundo mensajero MyD88 (Rhee y Hwang, 2000).

#### 2.4.6 Polimorfismos

Los polimorfismos en su mayor parte son solo polimorfismos de un nucleótido (SNP) son comunes variantes dentro de una población que se encuentran en una frecuencia superior al 1% (Zhang *et al.*, 2003). Los SNP son la forma más importante y frecuente de variación en el genoma y la mayoría de las diferencias genéticas entre individuos son de este tipo. La diferencia puede radicar en la sustitución, la inserción o la delección de una base. Se cree que hay aproximadamente 10 millones de estos polimorfismos en la especie humana, lo que significa que unas 10 millones de posiciones a lo largo del genoma (cada 300-500 nucleótidos) tienen variaciones frecuentes (Guttmacher y Collins, 2002) (Figura 6).

SNP puede alterar la secuencia del aminoácido (SNP no sinónimos), afectan las características del promotor, o puede ser completamente "silenciosas"(Zhang *et al.*, 2003). Llegado este punto, es importante señalar que los SNP que determinan un cambio de aminoácido en la proteína que codifica el gen son los menos frecuentes, seguidos de los que también se sitúan en la zona de codificación del gen pero no determinan ningún cambio en la estructura de aminoácidos de la proteína codificada. Los SNP más frecuentes son los situados en

la región promotora del gen (secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción), que pueden condicionar el nivel de producción de una proteína, y sobre todo los que se ubican en los intrones (la secuencia no codificante que interrumpe los exones de un gen). Se puede deducir, por consiguiente, que sólo una proporción relativamente pequeña de los SNP son funcionalmente relevantes, aunque todos tienen un valor potencial muy interesante como marcadores genéticos (Guttmacher y Collins, 2002). Las mutaciones no ocurren al azar dentro del genoma, sino más bien dependerá de la región genómica en particular, así como en su presión selectiva (Zhang *et al.*, 2003). Por el contrario, los polimorfismos son importantes cuando modifican la regulación del gen (SNP del promotor o del potenciador) o la estructura primaria del gen (SNP de exón). (Rodríguez de Castro *et al.*, 2005).

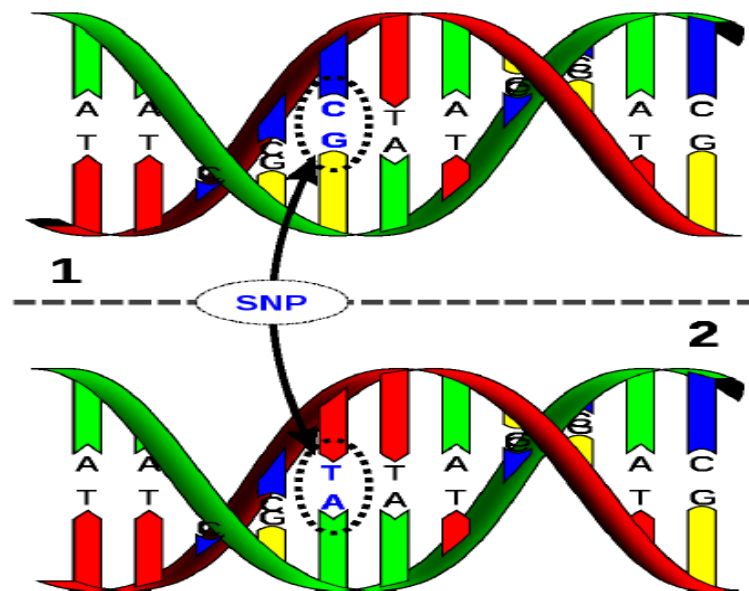


Fig. 6: Molécula de ADN 1 es diferente a la molécula 2 por la variación en un par de base (C/T).

Por ejemplo, en dos genomas humanos de la población moderna mundial muestreados al azar serán diferentes en aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  sitios (1 por cada 1300 pares de nucleótidos) (Alberts *et al.*, 2002). Así, se podría esperar que los genes que codifican las proteínas implicadas en la inmunidad o en la resistencia a enfermedades deban mostrar un alto número de polimorfismos, una hipótesis que se vio reforzada por datos obtenidos de la secuenciación del genoma humano (Marth *et al.*, 2001; Sachidanandam *et al.*, 2001). Los sitios mapeados en el genoma humano que son polimórficos son ampliamente usados para análisis genéticos en los

cuales se intenta asociar con la resistencia o susceptibilidad a enfermedades (Alberts *et al.*, 2002).

Polimorfismos y otras diferencias en la producción de las moléculas inmunes tales como los receptores tipo Toll (TLR's), tienen una profunda influencia en la respuesta contra el gran rango de patógenos y están asociados con la resistencia o la susceptibilidad de enfermedades. (Lazarus *et al.*, 2002). Dentro de los genes implicados en el reconocimiento inmunológico, varios SNPs que se han descrito son no sinónimos, incluyendo las moléculas de reconocimiento de patrones, citoquinas (Stüber *et al.*, 1996). En el caso de los TLR's, los polimorfismos pueden reducir la habilidad de las proteínas para reconocer los ligandos. (Mariotti *et al.*, 2009)

En estudios realizados en humanos se han detectado mutaciones sin sentido (missenses) que afectan el dominio extracelular del TLR4 siendo asociado a la sensibilidad del LPS, demostrando que los cambios en la secuencia genética pueden alterar la habilidad del hospedero en su respuesta hacia el estrés medioambiental (Arbour *et al.*, 2000). Así mismo existe una correlación entre el polimorfismo Asp299Gly ha sido descrito en la asociación con la hiporrespuesta contra el LPS, y la incidencia de casos de sepsis e infecciones por bacterias Gram negativas sugieren una asociación de las mutaciones con el incremento de la susceptibilidad del shock séptico (Lorenz *et al.*, 2002; Agnese *et al.*, 2002). Este mismo polimorfismo ha sido asociado con la susceptibilidad de los humanos frente a infecciones causadas HRSV (Tal *et al.*, 2004). Mientras que un estudio de investigación de la aterosclerosis carotídea se llegó a la conclusión de que polimorfismos del gen *tlr4* tiene un efecto protector sobre la aterogénesis (Hamann *et al.*, 2000).

En el gen *tlr2* se han descrito dos polimorfismos en humanos: Arg753Gln, en correlación con la incidencia de sepsis en una población blanca, y Arg677Trp, en correlación con la incidencia de la lepra lepromatosa en una población de Asia (Schroder y Hermann, 2003).

En *tlr5*, la mutación en la posición 1174 en la secuencia de codificación de la causa aparición de un codón de parada (Arg392stop) suprime la posibilidad de reconocer los flagelos de una manera dominante, tales mutaciones pueden ser asociadas a los casos de enfermedad de los legionarios, sobre todo en las poblaciones de los no fumadores (Hawn *et al.*, 2003). Sin embargo, la presencia de Arg392stop en TLR5 se asocia negativamente con la ocurrencia de la enfermedad de Crohn (Gewirtz *et al.*, 2006).



Un estudio reciente del análisis de polimorfismos en TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, y TLR10, investigó la asociación de los SNPs detectados con la tuberculosis. Homocigotos del haplotipo formado por dos SNP's en TLR1 (N248S y S602I) se asociaron significativamente con aumento del riesgo de la tuberculosis (Ma *et al.*, 2007).

En pollos las variaciones genéticas del *tlr4* han sido asociadas a susceptibilidad frente a infecciones con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Leveque *et al.*, 2003). Otro estudio en pollos ha sugerido una asociación entre un rasgo inmunológico (contenido de oxígeno de la sangre) con un polimorfismo en TLR4 (Ye *et al.*, 2006).

En los cerdos, se estudio polimorfismos en los genes de los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 porque estas son las moléculas comprometidas con la primera línea de defensa contra los mayores patógenos extracelulares responsables de las infecciones oportunistas en el cerdo. Se emplearon 96 animales procedentes de 11 diferentes razas, incluidos los habitualmente utilizados para la producción de carne (Landrace, Large White, Duroc y Berkshire). En total, se detectó 136 SNP's en los cinco genes TLR porcino, de los cuales 13 SNP's fueron del gen *tlr4*, en total 63 SNP's generaron sustituciones de aminoácidos. La distribución de los SNP que afectan a la codificación de aminoácidos fue parcial notablemente entre las regiones de SNP's. Muchos SNP's fueron distorsionadamente localizados en las secuencias que codifican los ectodominios de estos TLR, y estas SNP's no sinónimos poseían un alto nivel de heterocigosidad en comparación con las de otras regiones (Shinkai *et al.*, 2006).

En el ganado, los SNP's se han detectado en los genes TLR por varios grupos. En el ganado vacuno, un estudio de SNP's de TLR4 demostró que un SNP no sinónimos en la región central de la ectodominio ha sido seleccionado a través de la evolución positiva (White *et al.*, 2003). Womack y colegas también informó de la distribución de los SNPs en toda la secuencia genómica que contiene TLR1, TLR3, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, y TLR10 (Cargill *et al.*, 2007; Seabury *et al.*, 2007). Una variedad de polimorfismos en TLR4 y TLR9 también se han observado en las ovejas (Zhou *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008).

Mariotti y colaboradores (2009) lograron identificar 8 SNP's en genes de gran interés para el manejo del ganado, mediante la detección de las secuencias de nucleótidos de *TLR2*, *TLR4*, y *TLR6* en la especie bovina. Estas variaciones en los genes relacionados con la función inmune contribuirán a la investigación sobre la respuesta de la enfermedad en el ganado. De hecho, los

SNP's recientemente identificados se pueden utilizar en estudios de asociación entre los polimorfismos y ganado la resistencia a las enfermedades.

En base a esto, es posible que futuras investigaciones de SNP's del gen *tlr4* sean requeridas para analizar la asociación entre el polimorfismo y la resistencia o susceptibilidad a diversas enfermedades como neumonías en camélidos sudamericanos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de muestreo:

Las muestras patológicas fueron obtenidas durante la campaña de parición, específicamente en el mes de Febrero (2008, 2009, 2010) y en época de esquila (Octubre de los años 2007, 2008, 2009) en el Centro de Investigación y Producción C.I.P. La Raya UNA- Puno, centro ubicado en las coordenadas 14° 28' latitud Sur y 70° 56' latitud Oeste, zona donde la altitud es 4245 m.s.n.m. en promedio.

Adicionalmente se tomaron muestras en los distritos de Macusani (4315 m.s.n.m.) y Santa Lucía (4025 m.s.n.m.), ubicados en la Provincia de Carabaya y Provincia de Lampa, respectivamente.



Fig. 7: Ubicación de los lugares de muestreo

### 3.2 Animales

El estudio contempló un total de 57 muestras de crías con procesos neumónicos. Todas las muestras obtenidas procedieron de animales que fluctuaron entre 0 y 12 meses de edad. En la gran mayoría de los casos, los animales fueron hallados muertos, siendo trasladados a la sala de necropsia, salvo algunos casos donde la toma de muestra se realizó en campo. La hora de muerte fue considerado un factor importante para la selección de los animales, la cual no podía superar las 12 horas entre la muerte y la recolección de la muestra.

Los animales en estudio fueron en su mayoría animales enfermos, pero se emplearon animales sanos para determinar las alteraciones en el gen. Los animales sanos pertenecientes al estudio fueron comprados y sacrificados. La selección de estos animales se basó en las características fenotípicas poco deseadas: animales con fibra gruesa y manchada, orejas cortas o caídas, ojo zarco, mal aplomo. Previo al sacrificio, estos fueron evaluados mediante un examen clínico, determinándose que se encontraban aparentemente sanos. Las muestras que se obtuvieron de los múltiples órganos fueron derivadas a diversos estudios donde se requerían tener animales control, para el presente estudio se tomaron solo las muestras de sangre, hisopado bronquial y tejido pulmonar para proceder al aislamiento de los posibles agentes de los animales aparentemente sanos.

El grupo de los animales enfermos fue determinado por las lesiones macroscópicas compatibles con cuadros neumónicos. Solo en algunos de los animales fue posible determinar por medio de los signos clínicos el proceso neumónico: depresión, orejas dirigidas hacia atrás y anorexia; puede haber o no secreción por la nariz, tos, elevación de temperatura corporal y respiración superficial. La muerte ocurría entre 1 y 3 días después de aparecer las manifestaciones clínicas, como había sido descrito anteriormente por Ameghino y DeMartini (1991). En muchos de los casos no se logró observar la presencia de signos clínicos debido al curso rápido de un cuadro hiperagudo, generando que los animales amanezcan muertos, a pesar de haber estado aparentemente sanos días anteriores.

Las animales en el periodo de esquila suelen presentar cuadros neumónicos días posteriores a la esquila, se asume que debido al proceso de estrés al cual eran sometidas

debido a la manipulación de la actividad, generaba que el animal se inmunosuprima, disminuyendo su primera línea de defensa frente a los diferentes agentes infecciosos propios y extraños, logrando así que se inicie un proceso infeccioso que en la mayoría de los casos fueron cuadros neumónicos, además por la época del año no hay precipitaciones pero si la temperatura disminuye mucho (Heladas), además que las crías habiendo sido destetadas eran trasladadas hacia zonas más elevadas y a condiciones más extremas.

A su vez, el grupo de animales enfermos fue dividido en dos grandes subgrupos, en animales menores de 6 meses, considerados crías menores, y el grupo de animales mayores de 6 meses, considerado el grupo de crías mayores, muchas veces llamados tuis, en este grupo no se aceptaron animales que pasen el año de edad.

### 3.3 Toma de muestra

Las muestras patológicas para los estudios microbiológicos consistieron principalmente en hisopados tomados directamente de la secreción y exudados de la tráquea y bronquios pulmonares con la ayuda de un hisopo estéril y fueron colocados en medio Cary Blair para su transporte. Las muestras del parénquima pulmonar, fueron seleccionadas las zonas más afectadas en los animales con cuadros de neumonías, para ser almacenados en tubos estériles con Agar semisólido BHI, para el posterior aislamiento microbiológico.

Las muestras para análisis histopatológicos correspondieron a muestras de tejido pulmonar afectado (2 cm<sup>3</sup>) y ganglios linfáticos mediastínicos conservados en formol bufferado al 10%.

Para los estudios moleculares, las muestras de sangre fueron obtenidas y conservadas en refrigeración en tubos de 3ml con EDTA, para ser transportadas al laboratorio.

### 3.4 Aislamiento e identificación de patógenos

Para la identificación y aislamiento de agentes bacterianos, las muestras fueron sembradas en Agar McConkey y Agar Sangre, incubadas a 37 °C por 24 horas. La identificación de las colonias se realizó observando características morfológicas,

tintoriales (Tinción Gram) y bioquímicas (Anexo 1 y 2). Para la ejecución de las pruebas bioquímicas se empleo el kit comercial API 20NE de Biomerux<sup>®</sup>, siguiéndose las instrucciones del fabricante (Anexo 3).

Para la identificación de BRSV, se empleo la técnica de inmunofluorescencia directa, empleando antisuero policlonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína anti-BRSV (VRMD), siguiéndose las instrucciones del fabricante (Anexo 4).

### 3.5 Estudio Histopatológico:

Los tejidos fijados en formol bufferado al 10% fueron procesadas por medio de la técnica de histopatología convencional, embebidos en parafina, para luego ser reducidos, fijados y coloreados con hematoxilina-eosina.

La observación de las láminas histopatológicas se realizó empleando un microscopio de luz u óptico, siguiendo la técnica de observación establecida. Las lesiones encontradas fueron clasificadas según el tipo de exudación y según el grado de lesión del parénquima (Trigo, 2002).

### 3.6 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de sangre se utilizó el kit comercial *DNA Purification Kit de Wizard<sup>®</sup> Genomic*, la extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el ADN, se procedió a la evaluación de la calidad y cantidad del mismo para lo cual se empleó la técnica de electroforesis horizontal, utilizando la agarosa estándar (*Seakem<sup>®</sup>*), preparándose geles a una concentración del 0.8% con buffer TBE 0.5X. El marcador de peso molecular empleado fue fago lambda cortado con *Hind-III*, *Promega<sup>®</sup>*. Las condiciones de la corrida electroforética fueron 100 V, 100 A por un tiempo de 45 minutos. La tinción del gel fue en Bromuro de Etidio al 1%, visualizándose en un trasluminador.

### 3.7 Amplificación del gen *tlr4*

**3.7.1 Diseño de cebadores:** El primer par de cebadores fueron diseñados usando como base la secuencia de cebadores para porcinos (Shinkai *et al.*, 2006) que codifican para el tercer exón de la región codificante del dominio extracelular del TLR4, para lo cual se diseñaron cebadores degenerados. El segundo par de cebadores fueron diseñados en el estudio, tomando como referencia las secuencias de *tlr4* de bovino y porcino publicadas en el Genbank (Tabla 1).

Cuadro 1: Cebadores de PCR diseñados

| Cebador | Secuencia (5' – 3')    | Tamaño (bp) | Autor                  |
|---------|------------------------|-------------|------------------------|
| F5deg   | CAMTGAWTTTGGGACAACCA   | 621         | Shinkai <i>et al.</i>  |
| R5Deg   | AGCTGCYTCTGGTCCTTGAC   | 621         | Shinkai <i>et al.</i>  |
| F40     | TTCAGAACAACCTTGCTGCCTG | 345         | Diseñado en el estudio |
| R32     | TCTGGTCCTTGAGCCACTGCA  | 345         | Diseñado en el estudio |

**3.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Se empleó la técnica de PCR para la amplificación de los exones de la región codificante del dominio extracelular del TLR4. Para el desarrollo de la técnica se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa, recombinante 5U/μl (Invitrogen®), dNTP's y cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25 mM de Promega®; y el agua ultrapura de Ambion®.

Las condiciones estandarizadas fueron las siguientes: Mix 1.5 (dNTP's 200 μM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), primers 10 μM, 1 U de enzima *Taq* DNA polimerasa recombinante y 50-100 ng de ADN, en un volumen final de 20 μl.

Se hizo uso de un termociclador modelo *MyCycler thermal cycler* (BIORAD), para la obtención de los amplicones las condiciones fueron iguales para ambos pares de cebadores, variando solo la temperatura de hibridación (Tabla 2 y 3).

Cuadro 2: Condiciones de PCR para amplicón de 621 bp

| Fase                      |           | Temperatura | Tiempo     |
|---------------------------|-----------|-------------|------------|
| Desnaturalización inicial |           | 95° C       | 5 minutos  |
| Desnaturalización         | 30 ciclos | 94 °C       | 1 minuto   |
| Hibridación               |           | 56 °C       | 1 minuto   |
| Elongación                |           | 72 °C       | 1 minuto   |
| Extensión Final           |           | 72 °C       | 10 minutos |

Cuadro 3: Condiciones de PCR para amplicón de 345 bp

| Fase                      |           | Temperatura | Tiempo     |
|---------------------------|-----------|-------------|------------|
| Desnaturalización inicial |           | 95° C       | 5 minutos  |
| Desnaturalización         | 30 ciclos | 94 °C       | 1 minuto   |
| Hibridación               |           | 59 °C       | 1 minuto   |
| Elongación                |           | 72 °C       | 1 minuto   |
| Extensión Final           |           | 72° C       | 10 minutos |

**3.7.3 Visualización del producto de PCR:** se preparo un gel al 2% de concentración con TBE 0.5X, la tinción se realizo en Bromuro de Etidio al 1%. El marcador de peso molecular de 100 bp Perfect DNA Marker (Novagen®), el cual nos ayudo a establecer el tamaño del amplicón obtenido.

**3.7.4 Purificación del amplificado:** Se purificaron los amplicones utilizando un kit comercial (Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System- Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5).



### 3.8 Secuenciación y Análisis de secuencias

La región amplificada se envió a centros especializados donde se procedió a la secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias existentes en la base de datos de BLASTN ([www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih)), y analizadas en el programa BioEdit. Las secuencias de ADN y de proteínas fueron comparadas con la de otras especies relacionadas a las alpacas.

### 3.9 Estudio del polimorfismo del gen

Para la determinación de polimorfismos las secuencias fueron alineadas y comparadas entre sí usando el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Se comparó la presencia/ausencia de polimorfismos y la presencia/ausencia de salud o enfermedad.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Histopatología

#### 4.1.1 Hallazgos Macroscópicos

Los hallazgos macroscópicos de campo muestran una alta frecuencia (13/30) de casos con congestión difusa y edema pulmonar en las crías menores de 6 meses, en cambio en las crías mayores de 6 meses hubo mayor frecuencia de casos con bronconeumonía extensiva y pleuritis fibrinosa (11/27), tal como se muestra en la tabla 4.

Cuadro 4: Hallazgos Macroscópicos en campo

| Diagnostico Macroscópico                              | Nº de casos crías < 6 meses | Nº de Casos crías > 6 meses |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Bronconeumonía extensiva y pleuritis fibrinosa</b> | 7<br>(23.3%)                | 11(40.8%)                   |
| <b>Bronconeumonía multilobal</b>                      | 10<br>(33.3%)               | 8 (29.6%)                   |
| <b>Congestión difusa y edema pulmonar</b>             | 13<br>(43.4%)               | 8 (29.6%)                   |
| <b>Total</b>  | <b>30</b>                   | <b>27</b>                   |

En los casos de bronconeumonía extensiva/multilobal y pleuritis fibrinosa, los cambios patológicos estuvieron asociados a consolidaciones multifocales en las áreas cráneo ventrales principalmente comprometiendo los lóbulos craneales y cardiacos y en menor grado el lóbulo posterior (Figuras 8, 9, 10). 8 de los pulmones del grupo de crías mayores de 6 meses presentaron severa adherencias fibrinosas a las paredes costales y algunas veces la superficie pulmonar se mostró crepitante presentando formaciones bullosas (Figura 11). La incisión de las partes afectadas evidenció zonas consolidadas rojizas exudando abundante material sanguinolento espumoso. Las mucosas traqueales y bronquiales congestionadas mezcladas con mínima a moderada cantidad de espuma blanquecina y algunas veces de color cremoso (Figura 12). Los nódulos pulmonares se presentaron aumentados de tamaño y congestionados.

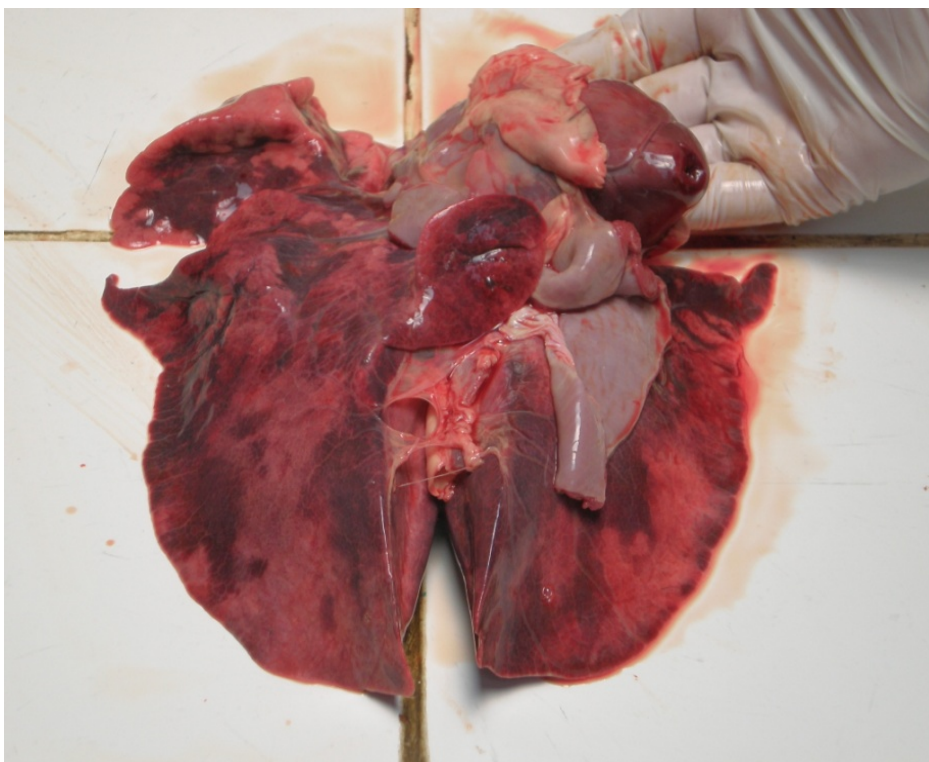


Fig. 8: Pulmones mostrando consolidaciones multifocales principalmente en lóbulos posteriores (severa y extensiva bronconeumonía).



Fig. 9: Tejido pulmonar con consolidaciones rojizas en áreas ventrales de los lóbulos craneal y cardíaco.

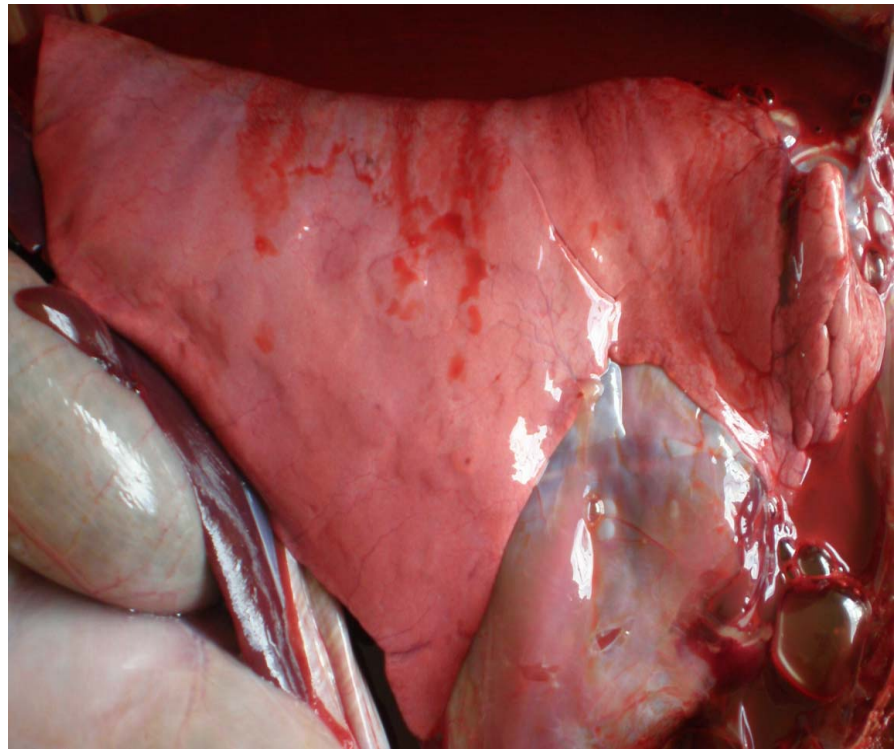


Fig. 10: Pulmón presentando consolidaciones cráneo ventrales en lóbulo anterior.

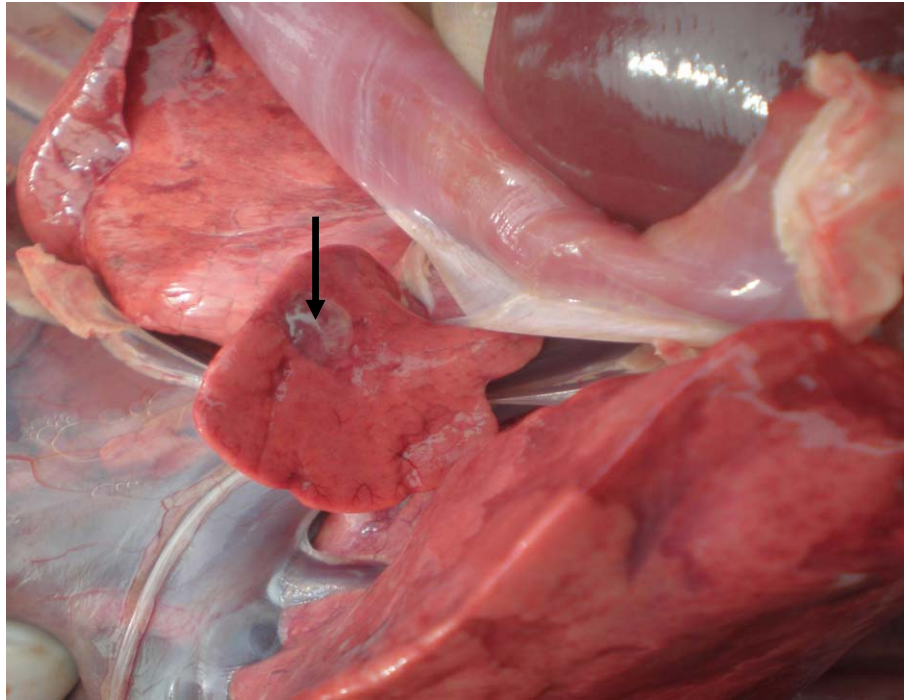


Fig. 11: Pulmones mostrando consolidación focal y formaciones de bulla enfisematosa (flecha)

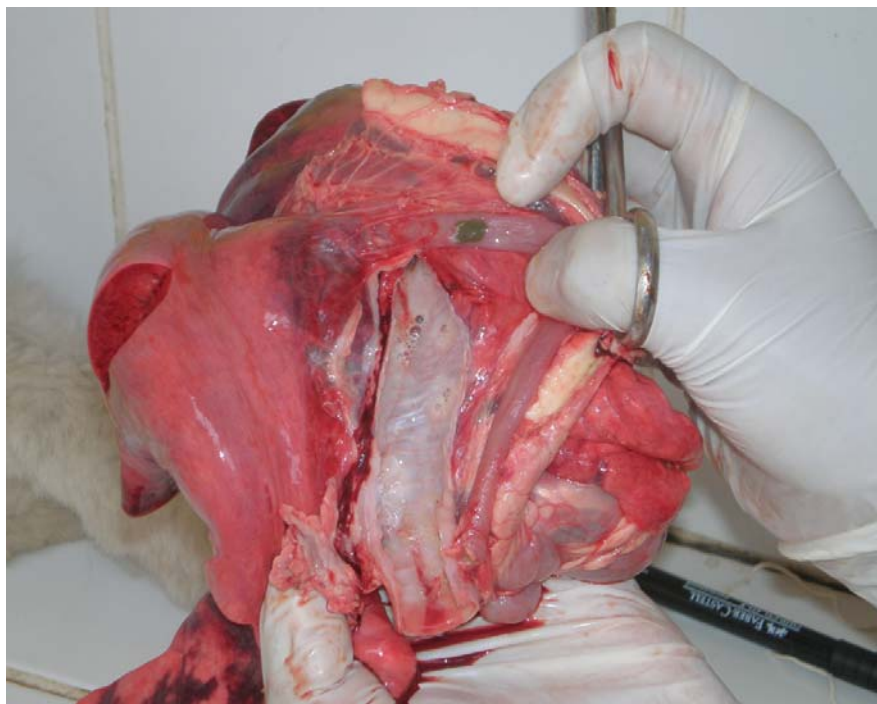


Fig. 12: Pulmones con consolidaciones focales y presencia de material espumoso intratraqueal.



En la mayoría de los casos de congestión difusa y edema pulmonar, los pulmones se encontraban aumentados de tamaño mostrando externamente una uniforme congestión muchas veces abarcando todo el lóbulo (Figura 13) dando un aspecto húmedo y brillante y que al corte exudaba abundante cantidad de material sero-sanguinolento mezclado con espuma rosada. Los nódulos linfáticos adyacentes ligeramente aumentado en tamaño con el parénquima enrojecido.



Fig. 13: Tejido pulmonar evidenciando una severa congestión difusa comprometiendo extensivamente el lóbulo posterior derecho.

#### 4.1.2 Hallazgos Microscópicos

Los hallazgos microscópicos muestran una alta frecuencia (13/30) de casos con moderada congestión difusa y edema en las crías menores de 6 meses y crías mayores de 6 meses (8/27), tal como se muestra en la tabla 5.

Cuadro 5: Hallazgos Microscópicos

| Diagnostico Microscópico                                     | Nº de casos<br>crías < 6<br>meses | Nº de<br>Casos<br>crías > 6<br>meses |
|--|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Severa bronconeumonía fibrino-supurativa difusa aguda</b> | 5(16.7%)                          | 6 (22%)                              |
| <b>Moderada bronconeumonía supurativa difusa aguda</b>       | 10(33.3%)                         | 7 (26%)                              |
| <b>Moderada a severa congestión difusa aguda y edema</b>     | 13 (43.3%)                        | 8 (30%)                              |
| <b>Moderada bronconeumonía no supurativa difusa aguda</b>    | 2 (6.7%)                          | 6 (22 %)                             |
| <b>Total</b>   | <b>30</b>                         | <b>27</b>                            |

En los cuadros de severa bronconeumonía fibrino-supurativa difusa aguda, los cambios más comunes en este grupo fueron moderados a severas infiltraciones de células polimorfonucleares engrosando las paredes alveolares y que algunas veces ingresan al interior de los espacios alveolares y bronquiales. En todos estos casos (n=6) pertenecientes al grupo de crías mayores de 6 meses se observaron depósitos de fibrina extensivamente distorsionando y destruyendo el parénquima pulmonar (Figura 14). En otros casos se evidenció la pérdida de arquitectura parénquimal asociada a descamaciones epiteliales intrabronquiolares (Bronquiolitis necrotizante). Los vasos sanguíneos se hallaron generalmente pletorizados mixtos con extravasaciones focales de eritrocitos y aun presencia de material eosinofílico (edema). La pleura estuvo engrosada mostrando depósitos de fibrina e infiltración de polimorfo nucleares.

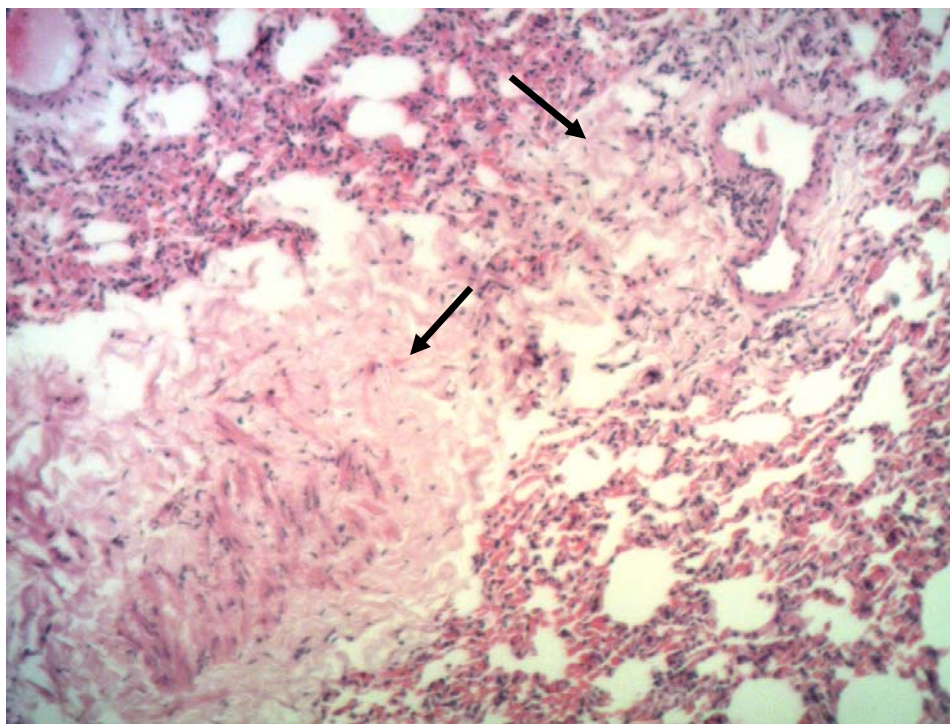


Fig. 14: Obsérvese presencia de depósitos de fibrina distorsionando el parénquima pulmonar e infiltrado con exudado inflamatorio (10X) (Flechas)

Los cambios histopatológicos en el grupo de moderada bronconeumonía supurativa difusa aguda, mostró, con excepción a los depósitos de fibrina, que son muy similares al grupo anterior. Las infiltraciones de células inflamatorias fueron mucho más intensos no solamente ocupando el intersticio si no también espacios alveolares y aún intraluminalmente en vasos sanguíneos (Figura 15). El epitelio de los bronquiolos dependiendo de grado destructivo se encontraba difusamente necrosado, descamado o hiperplásico (Figura 16). Se observaron también, depósitos de material membranoso proteico (mucus), fibrina y edema en lúmenes de los alveolos, bronquios algunas veces asociados a presencia de nidos bacterianos.

Se caracterizó por la presencia de polimorfonucleares infiltrados en las paredes alveolares, tornándolas más gruesas y en la luz alveolar, en casos más severos estos podían estar presentes en la luz de los vasos sanguíneos y bronquios. Los vasos sanguíneos mostraron una moderada pletorización, y en algunos casos se observó líquido eosinofílico (edema) en muy poca cantidad. Hubo evidencia de casos de bronquiolitis necrotizantes, debido a que el epitelio bronquial se encontraba en su totalidad degenerado y necrosado (Figura 16), en casos más leves, solo se evidencio la



descamación del epitelio y una leve hiperplasia del epitelio bronquial, en algunos casos se evidenció la presencia de mucus en el interior de los bronquios, así como algunos eritrocitos.

El mucus también fue observado en la luz de los alvéolos, así como depósitos de fibrina (la cantidad variaba dependiendo del grado de la lesión), y en algunas veces se lograba observar nidos bacterianos. En los casos moderados la presencia de macrófagos alveolares fue más evidente que en los casos leves, además había infiltración de algunas células mononucleares (linfocitos) en el parénquima, así como detritus celular. La pleura no se vio afectada, como en los casos severos.

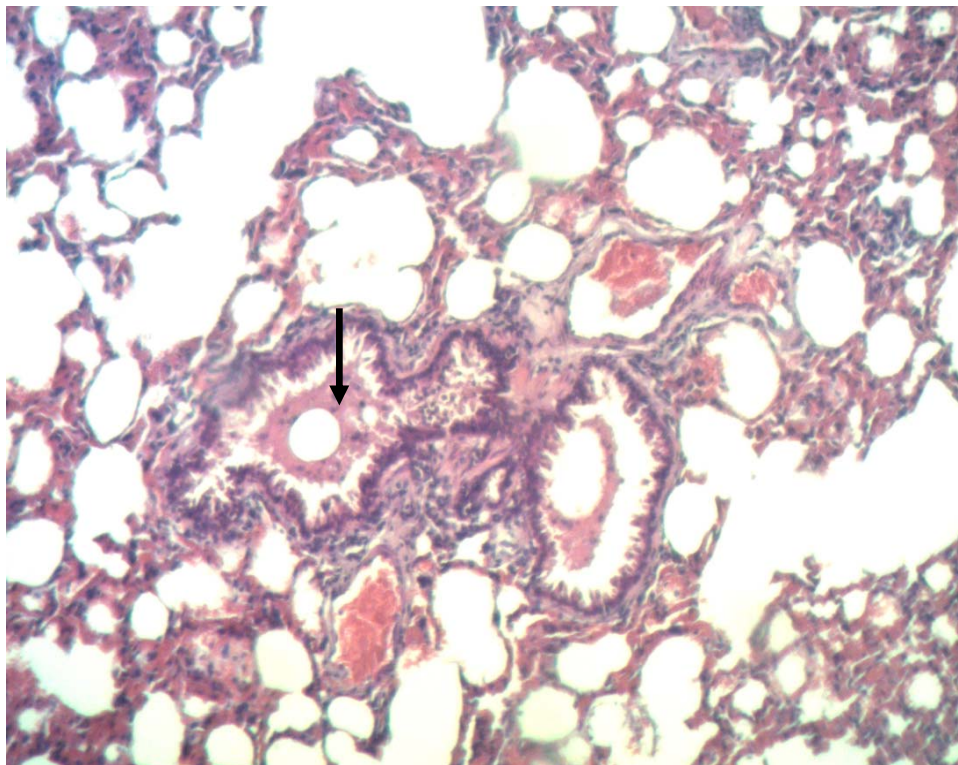


Fig. 15: Pérdida de la estructura bronquial, presencia de mucus, células inflamatorias y eritrocitos dentro de los bronquios (Flecha). Paredes alveolares con infiltración de linfocitos y células inflamatorias (10X).

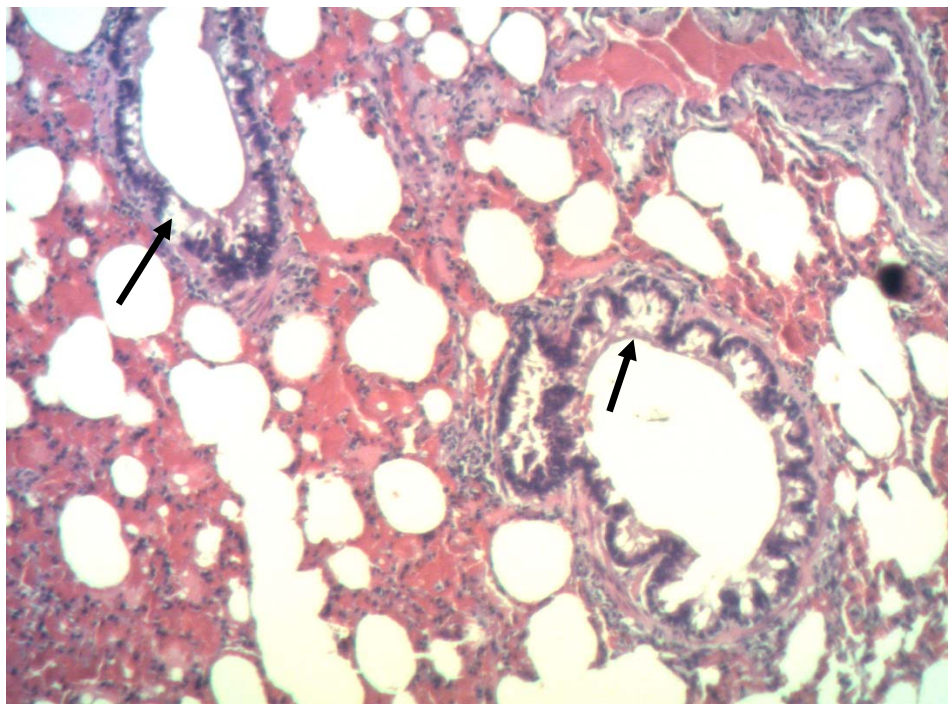


Fig. 16: Descamación del epitelio bronquiolar, así como la pérdida de la estructura células (10X) (Flechas).

Los cambios histopatológicos en los cuadros de moderada a severa congestión y edema pulmonar se concentraron en presencia de vasos sanguíneos pletorizados, moderada a severa congestión asociada a depósitos de material eosinofílico (edema) ocupando, en algunos casos, espacios bronquiales. Paralelamente, se observaron presencia de eritrocitos infiltrando y engrosando las paredes alveolares (Figura 17) que en algunas veces ocupaban espacios alveolares con mínima a moderada infiltración de células inflamatorias mixtas de polimorfonucleares y linfocitos en el parénquima pulmonar. En algunos casos se observaron ruptura de las paredes alveolares (enfisema) (Figura 18), así como depósitos focales parduzcos (hemosiderosis) y en otras una ligera descamación epitelial, e hiperplasia en bronquios.



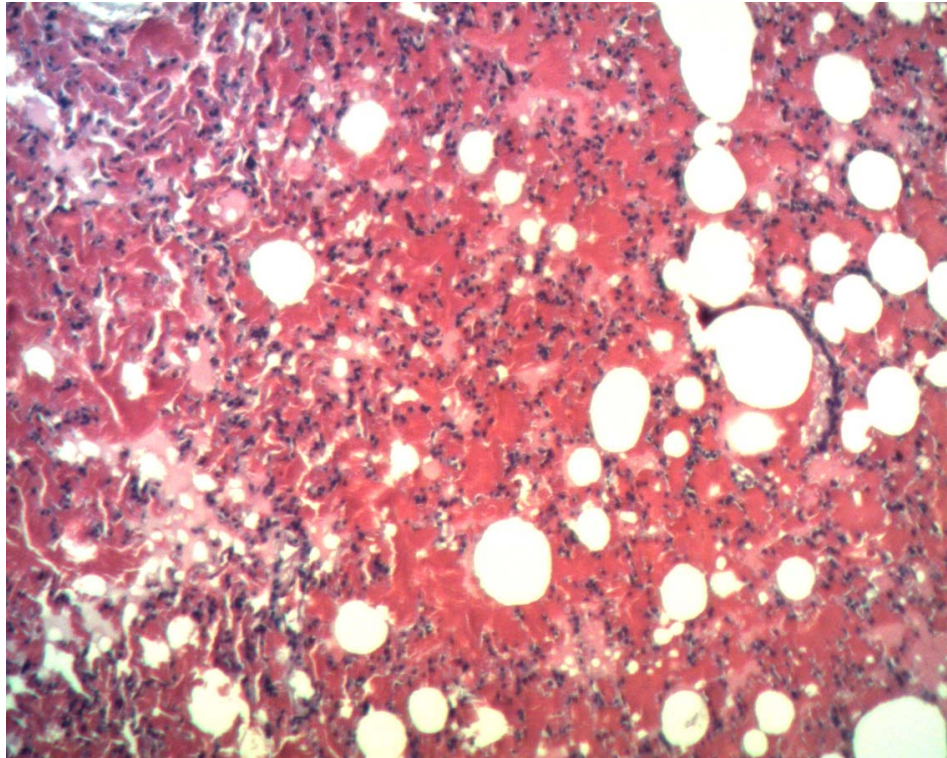


Fig. 17: Tejido pulmonar con pérdida de la arquitectura alveolar y asociada con una extensiva congestión, extravasación de eritrocitos e infiltración inflamatoria (10X).

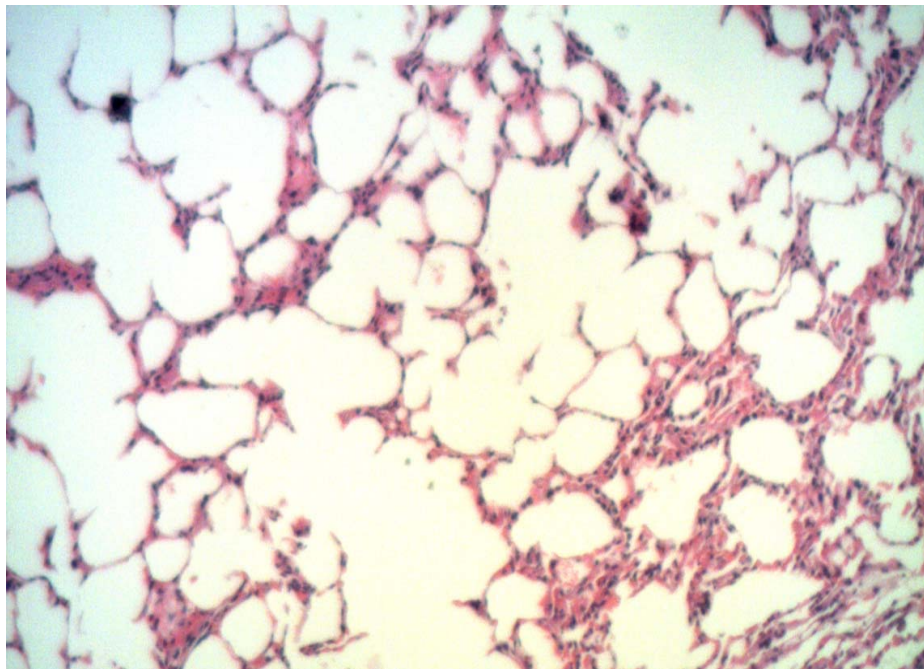


Fig. 18: Parénquima pulmonar con extensiva ruptura de paredes alveolares (enfisema) (10X).

Solo se presentaron 4 casos de moderada bronconeumonía no supurativa difusa aguda, los cambios estuvieron asociados a infiltraciones inflamatorias principalmente por células mononucleares invadiendo el parénquima, luz alveolar y bronquial. En estos casos las células inflamatorias se agregaban alrededor de los bronquios (Figura 19) y en un solo caso los agregados estuvieron dispersos multifocalmente. Las alteraciones epiteliales bronquiolares fueron mínimas.

Solo 3 casos fueron positivos a *P.multocida*, 2 positivos a *M. haemolytica*, donde en uno de ellos existía la presencia de ambas especies, así mismo existió la presencia de BRSV(n=2). Se evidencio un exudado de tipo no supurativo, las células monocucleares estaban distribuidas por todo el parénquima, en la luz de los alvéolos y bronquios e infiltrado las paredes alveolares. Estos linfocitos a su vez mostraban agregados alrededor de los bronquios (agregados peribronquiales), los cuales estaban de manera organizada. Solo en uno de los casos se observo agregados linfoides en múltiples zonas del parénquima. Los bronquios no mostraron descamación del epitelio. La presencia de eritrocitos infiltrados en las paredes alveolares y algunos extravasados. Los vasos sanguíneos y capilares mostraban moderada pletorización.

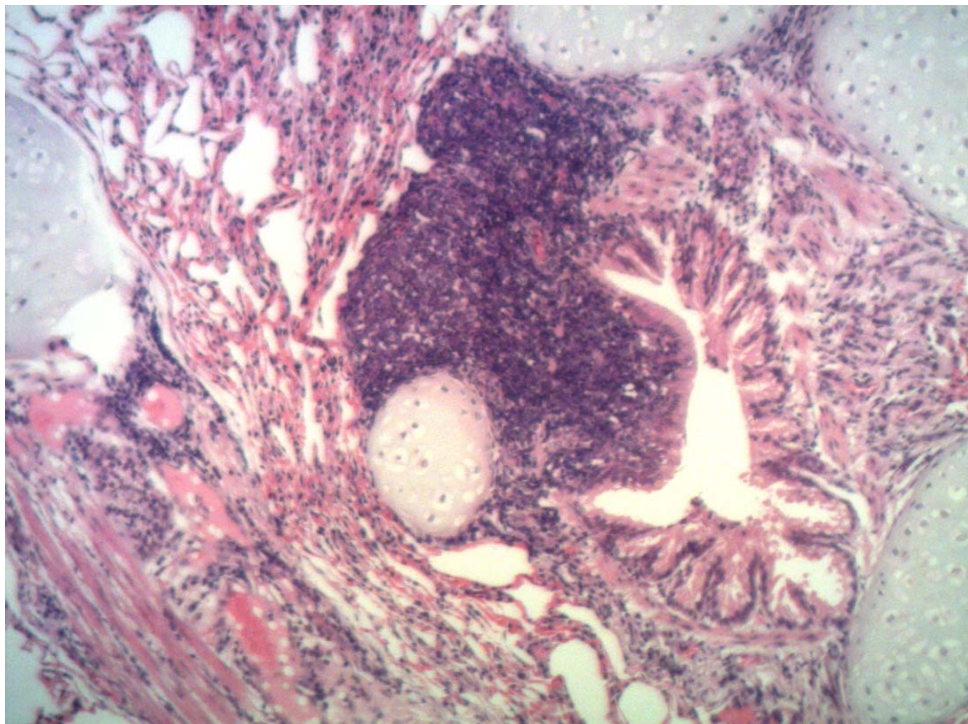


Fig. 19: Tejido pulmonar mostrando agregado linfoide en zona peribronquial. Muestra positiva a *P.multocida*, *Streptococcus sp.* y BRSV (10X).

#### 4.2 Aislamiento e identificación de *P. multocida* y *M. haemolytica*

La detección de agentes bacterianos presentes en los pulmones en estudio fue de 93%, debido a que se hallaron bacterias de diferentes especies en 53 de los 57 pulmones (Tabla 6). Se logró aislar *P. multocida* de 33 de las 57 muestras totales, teniéndose en general un 57.9 % de casos de neumonías causados por esta bacteria, en el primer grupo se aisló la bacteria de 18 animales y en el segundo de 15 animales, dando una proporción de 60% y 55.6% de aislamiento respectivamente. *M. haemolytica* fue la segunda bacteria hallada en mayor proporción, teniendo un 38.6%, observándose 22 de 57 casos positivos a esta bacteria, la bacteria se aisló de 12 animales del primer grupo y de 10 animales del segundo grupo (Tabla 7).

Cuadro 6: Detección de agentes bacterianos en 57 neumonías agudas en alpacas

| Edad            | Agentes Bacterianos |
|-----------------|---------------------|
| Crías < 6 meses | 28/30               |
| Crías > 6 meses | 25/27               |
| <b>Total</b>    | <b>53/57 (93%)</b>  |

Además se aislaron otros agentes bacterianos, como *Streptococcus sp.* (21%), *Staphylococcus sp.* (29.8%) y *E.coli* (12.3%) (Tabla 7).

Cuadro 7: Detección de agentes bacterianos en 53/57 neumonías agudas en alpacas

| Edad                      | <i>Pm</i>           | <i>Mh</i>                      | <i>Strep.</i>                | <i>Staph.</i>                  | <i>E.coli</i>       |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | 18/30 (60%)         | 12/30                          | 6/30                         | 10/30                          | 3/30                |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | 15/27(55.6%)        | 10/27                          | 6/27                         | 7/27                           | 4/27                |
| <b>Total</b>              | <b>33/57(57.9%)</b> | <b>22/57</b><br><b>(38.6%)</b> | <b>12/57</b><br><b>(21%)</b> | <b>17/57</b><br><b>(29.8%)</b> | <b>7/57 (12.3%)</b> |

*Pm: Pasteurella multocida*

*Mh: M. haemolytica*

*Strep: Streptococcus sp.*

*Staph: Staphylococcus sp.*

Por otro lado, se pudo determinar que existía interacción de agentes bacterianos en un mismo animal, es decir, la infección no solo era causada por una sola especie. Lográndose aislar hasta tres especies bacterianas diferentes de un mismo individuo, *P. multocida* y *M. haemolytica* mostraron presentación única y coexistencia con dos o más bacterias, siendo más predominante la interacción de ambas con *Staphylococcus sp.*, lográndose encontrar mayor presentación de esta asociación en crías menores de 6 meses (n=6). También se pudo aislar *Streptococcus sp.* y *Escherichia coli* (Tabla 8).

Cuadro 8: Interacción de agentes bacterianos en neumonías agudas en alpacas

| Edad                      | 1 Bacteria  | 2 Bacterias   | 3 Bacterias   |
|---------------------------|---|---|---|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | <i>Pm</i> (n=6)<br><i>Mh</i> (n=4)<br><i>Strep</i> (n=2)<br><i>Staph</i> (n=1)<br><i>E.coli</i> (n=0) | <i>Pm</i> + <i>Strep.</i> (n=3)<br><i>Pm</i> + <i>Staph.</i> (n=2)<br><i>Pm</i> + <i>E.coli</i> (n=1)<br><i>Mh</i> + <i>E.coli</i> (n=2)<br><i>Strep</i> + <i>Staph</i> (n=1) | <i>Pm</i> + <i>Mh</i> + <i>Staph</i> (n=6)  |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | <i>Pm</i> (n=4)<br><i>Mh</i> (n=3)<br><i>Strep</i> (n=2)<br><i>Staph</i> (n=0)<br><i>E.coli</i> (n=1) | <i>Pm</i> + <i>Strep.</i> (n=3)<br><i>Pm</i> + <i>Staph.</i> (n=4)<br><i>Mh</i> + <i>E.coli</i> (n=2)<br><i>Mh</i> + <i>Staph.</i> (n=1)<br><i>Pm</i> + <i>Mh</i> (n=3)       | <i>Pm</i> + <i>Mh</i> + <i>Staph</i> (n=1)<br><i>Strep</i> + <i>Staph</i> + <i>E.coli</i> (n=1) |

*Pm: Pasteurella multocida*

*Mh: M. haemolytica*

*Strep: Streptococcus sp.*

*Staph: Staphylococcus sp.*



#### 4.3 Identificación de BRSV

La detección de agentes virales presentes en los pulmones en estudio fue de 24%, debido a que se hallaron antígenos virales en 6 de los 25 pulmones, de los cuales 1 animal positivo fue cría menor de 6 meses y el resto perteneció al grupo de crías mayores de 6 meses (Tabla 9).

Cuadro 9: Detección de BRSV en 6/25 neumonías agudas en alpacas

| Edad            | BRSV              |
|-----------------|-------------------|
| Crías < 6 meses | 1/10              |
| Crías > 6 meses | 5/15              |
| <b>Total</b>    | <b>6/25 (24%)</b> |

BRSV: Virus Respiratorio Sincitial Bovino

#### 4.4 Interacción Virus - Bacterias

La interacción de diferentes tipos de patógenos se evidenció en 6 animales de los 25 en estudio. Existiendo asociación entre BRSV y *P. multocida* (n=2), a la vez se mostró un caso de asociación de ambos agentes con *Streptococcus sp.* (n=1) y *Staphylococcus sp.* (n=1). *M.haemolytica* estuvo presente junto a *Staphylococcus sp.* (n=1). Cabe resaltar que todos estos casos mencionados pertenecieron al grupo de crías mayores a 6 meses de edad. En el grupo de crías más pequeñas, no se observó la presencia de *P. multocida* y *M.haemolytica*, en las muestras estudiadas (Tabla 10).

Cuadro 10: Coexistencia de virus y bacterias en cuadros de neumonías agudas en alpacas.

| Edad            | BRSV  |
|-----------------|---|
| Crías < 6 meses | Strep+ Staph. (n=1)   |
| Crías > 6 meses | Pm (n=2)<br>Pm+ Strep. (n=1)<br>Pm+ Staph. (n=1)<br>M.h+ Staph. (n=1) |

## 4.5 Análisis de Secuencias

Los productos de PCR (Anexo 6) fueron analizados con el uso del programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), determinando en primera instancia si era el amplicón deseado. Luego las secuencias fueron visualizadas con el uso del programa Bioedit, por medio del cual se pudo observar los cromatogramas y determinar la presencia de los picos que sugerían la presencia de SNP's (Figura 20). Las secuencias fueron analizadas para cada uno de los individuos, las secuencias Forward y Reverse fueron alineadas con el uso del programa Clustal W, determinándose la secuencia consenso para cada uno de los individuos, que nos sugería las posibles variaciones en los pares de bases (Figura 21).

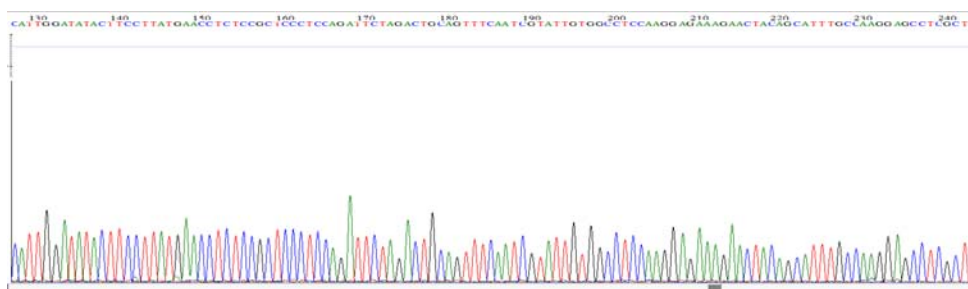


Fig. 20: Cromatograma del *gen tlr4* de una alpaca sana.

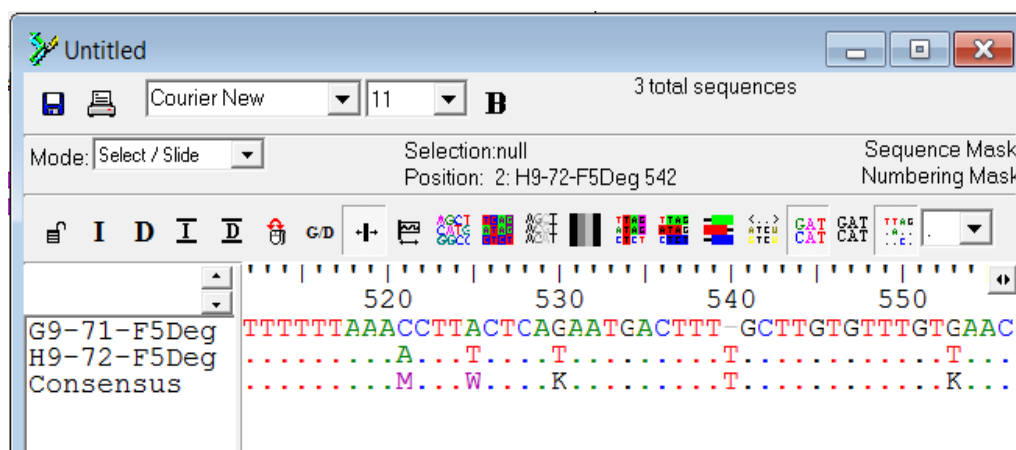


Fig. 21: Secuencia consenso determinando los SNP's propios del individuo.

Luego del análisis y edición de las secuencias, se obtuvo la secuencia consenso real. A esta misma secuencia se le realizó un Blast para establecer su verdadera similitud con las secuencias de *tlr4* de otras especies ubicadas en el GenBank (Tabla 11).



El amplicón de 345 bp presentaba mayor similitud con mamíferos marinos (orca, delfín del pacífico, cachalote), seguido de rumiantes (búfalo, ovinos, caprinos, bovinos) y porcinos. De igual manera el amplicón de 621 bp presentó mayor similitud con mamíferos marinos (orca, delfín del pacífico, cachalote), pero mostró mayor semejanza con las secuencias de porcinos, seguido de las secuencias de rumiantes.

Cuadro 11: Blast de la secuencia parcial de *tlr4* obtenida.

| Descripción   | Mx Score | E-value   | % Max<br>Identidad |
|---|----------|-----------|--------------------|
| Orcinus orca TLR4 mRNA for Toll like receptor 4, complete cds               | 412      | 7.00E-112 | 90%                |
| Lagenorhynchus obliquidens TLR4 mRNA for Toll like receptor 4, complete cds | 408      | 9.00E-111 | 90%                |
| Balaenoptera acutorostrata TLR4 gene for Toll like receptor 4, partial cds  | 403      | 4.00E-109 | 90%                |
| Physeter catodon TLR4 gene for Toll like receptor 4, partial cds            | 394      | 2.00E-106 | 89%                |
| Tursiops truncatus TLR4 mRNA for toll-like receptor 4, complete cds         | 394      | 2.00E-106 | 89%                |
| Bison bison toll-like receptor 4 (TLR4), exon 3                             | 363      | 3.00E-97  | 86%                |
| Capra hircus Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA, partial cds                  | 361      | 1.00E-96  | 86%                |
| Bubalus bubalis toll-like receptor 4 gene, complete cds                     | 361      | 1.00E-96  | 86%                |
| Ovis aries Toll-like receptor 4 mRNA, partial cds                           | 361      | 1.00E-96  | 86%                |
| Capra hircus Toll-like receptor 4 mRNA, partial cds                         | 361      | 1.00E-96  | 86%                |
| Bos indicus toll-like receptor 4 precursor (TLR4) gene, complete cds        | 358      | 1.00E-95  | 86%                |
| Bos taurus toll-like receptor 4 (TLR4) gene, complete cds                   | 358      | 1.00E-95  | 86%                |
| Sus scrofa TLR4 mRNA for Toll-like receptor 4, complete cds                 | 356      | 5.00E-95  | 86%                |

Se reconocieron a los individuos que presentaban SNP's, los cuales estuvieron presentes en una proporción 2/10 animales evaluados. Ambos animales fueron positivos al aislamiento de *P.multocida* y negativo para otros agentes bacterianos y virales (Tabla 12). El resto de animales enfermos no presentaron variaciones en la secuencia del *tlr4* evaluado y estas fueron iguales a la de los animales sanos.

Cuadro 12: Relación entre SNP's y agentes patógenos.

| Nº               | Bacterias            | Virus | SNP's |
|------------------|----------------------|-------|-------|
| <b>Enfermo 1</b> | Pm                   | neg.  | No    |
| <b>Enfermo 2</b> | Pm+ Strep            | Sd    | No    |
| <b>Enfermo 3</b> | Pm                   | Sd    | Si    |
| <b>Enfermo 4</b> | Pm+ Mh+ <i>Staph</i> | Sd    | No    |
| <b>Enfermo 5</b> | Pm+ Mh               | neg.  | No    |
| <b>Enfermo 6</b> | Pm                   | neg.  | Si    |
| <b>Sano 1</b>    | neg.                 | neg.  | No    |
| <b>Sano 2</b>    | neg.                 | neg.  | No    |
| <b>Sano 3</b>    | neg.                 | neg.  | No    |
| <b>Sano 4</b>    | neg.                 | neg.  | No    |

Pm: *Pasteurella multocida*  
Mh: *M. haemolytica*  
Strep: *Streptococcus sp.*  
Staph: *Staphylococcus sp.*  
Sd: Sin determinar

Se realizó un alineamiento entre las especies más representativas según el Blastn, comparando las secuencias de los individuos con las secuencias genómicas de bovino, porcino, ovino, caprino y orca publicadas en el Genbank (Nº: NM174198, GQ503242.1, GU461886.1, HM627213.2, AB492857.1). Se observó gran similitud entre las secuencias, con algunas variaciones de pares de bases entre especies (Figura 22).

|         |  |      |
|---------|--|------|
| Alpaca  | GGCTGGCAATTCTTTTCAGAACAACCTTGCTGCCTGATATTTTCACAGAGGTGACTAACTT  | 261  |
| Porcino | GGCTGGCAATTCTTTTCAGAACAACCTTGCTTCCTGATGTCTTCACAGATCTGACTAACTT  | 8339 |
| Orca    | GGCAGGCAATTCTTTTCAGAACAACCTTGCTTCCTGATATCTTCACAGAACTGACGAACCTT | 1493 |
| ovino   | GGCAGGCAACTCTTTTCAGAACAACCTTGCTCCCTGACATCTTCACAGAGCTGACTAACTT  | 259  |
| Cabra   | GGCAGGCAACTCTTTTCAGAACAACCTTGCTCCCTGACATCTTCACAGAGCTGACTAACTT  | 2265 |
| Vaca    | GGCAGGCAACTCTTTTCAGAACAACCTTGCTCCCTGACATCTTCACAGAACTGACTAACTT  | 1493 |
|         | *** *****  |      |
| Alpaca  | AACCATCTTGACCTCTCTAAGTGCCAACCTGGAACAGCTATCCCAGCGGGCATTTGACCC   | 321  |
| Porcino | AATCCTCCTGGACCTCTCTAAGTGTCAACTGGAACAGGTATCCCAGAGGGCATTTCATT    | 8399 |
| Orca    | AACCATCCTGGACCTCTCTAAGTGTCAACTGGAACGGGTATCCCAGATGGCATTTCACCT   | 1553 |
| ovino   | AACCATCTTGACCTCTCTAAGTGTCAACTGGAACAGGTGTCCTGGACGGCATTTCACCT    | 319  |
| Cabra   | AACCATCTTGACCTCTCTAAGTGTCAACTGGAACAGGTGTCCTGGACGGCATTTCACCT    | 2325 |
| Vaca    | AACCGTCTTGACCTCTCTAAGTGTCAACTGGAACAGGTAGCCAGACAGCATTTCACCT     | 1553 |
|         | ** * ** *****  |      |
| Alpaca  | CCTCACTAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCATTGGATATACT     | 381  |
| Porcino | CCTCCCTAGGCTTCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAGACTCTTGTTCTTGGATACACT   | 8459 |
| Orca    | CCTCCCTAACTTCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCATTGGATACACT     | 1613 |
| ovino   | CCTCCCTAGCCTTCAGGTGCTGAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCATTGGATACATT    | 379  |
| Cabra   | CCTCCCTAGCCTTCAGGTGCTGAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCATTGGATACATT    | 2385 |
| Vaca    | CCTCTCTAGCCTTCAGGTGCTGAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCATTGGATACATT    | 1613 |
|         | **** ** *  |      |
| Alpaca  | TCCTTATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGC   | 441  |
| Porcino | TCCTTATAAACCCTCCACTCCCTCAGGATTCTGGATTGCAGTTACAACTTATCGTGGC     | 8519 |
| Orca    | TCCTTATAAACCCTCCACTCCCTCCAGATTCTGGACTGCAGTTTCAACCGTATCATGGA    | 1673 |
| ovino   | TCTTTATGAACCACTCCACTCGCTCCGGATCCTAGACTGCAGTTTCAACCGTATCACGGC   | 439  |
| Cabra   | TCTTTATGAACCACTCCACTCGCTCCGGATCCTAGACTGCAGTTTCAACCGTATCACGGC   | 2445 |
| Vaca    | TCTTTATGAACCACTCCACTCGCTCCGGATCCTAGACTGCAGTTTCAACCGTATCATGGC   | 1673 |
|         | ** *****   |      |
| Alpaca  | CTCCAAGGAGAAAGAACTACAGCATTGCGCAAGGAGCCTCGCTTTTTTAAACCTTACTCA   | 501  |
| Porcino | CTCCAAGGAACAAGAACTACAGCATCTGCCAAGGAGCCTAGCTTTTTTAAATCTCACTAA   | 8579 |
| Orca    | GTCCAAGGAGCAAGAACTACAGCATTGCGCAAGGAGCCTTGCTTTGTTAAATCTTACTCA   | 1733 |
| ovino   | CTCTAAGGAGCAAGAACTACGGAATTGCGCAAGGAGCCTCACTTGGCTAAATCTTACTCA   | 499  |
| Cabra   | CTCTAAGGAGCAAGAACTACGGAATTGCGCAAGGAGCCTCACTTGGCTAAATCTTACTCA   | 2505 |
| Vaca    | CTCTAAGGAGCAAGAACTACAGAATTGCGCAAGGAGCCTCACTTGGCTAAATCTTACTCA   | 1733 |
|         | ** *****   |      |
| Alpaca  | GAATGACTTTGCTTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTCAAGGACCAG--  | 559  |
| Porcino | GAATGACTTTTCTTTGTGCTGTGAACACCAGACTTTCTTGCAAGTGGGTCAAGGACCAGAA  | 8639 |
| Orca    | GAATGACTTTGCTTTGTGTTTGTGAACACCAGAGTTTCCTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAG  | 1793 |
| ovino   | GAATGAATTTGCTTTGTGTTTGTGAACATCAGAGTTTCCTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAG  | 559  |
| Cabra   | GAATGAATTTGCTTTGTGTTTGTGAACATCAGAGTTTCCTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAG  | 2565 |
| Vaca    | GAATGCATTTGCTTTGTGTTTGTGAACATCAGAGTTTCCTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAG  | 1793 |
|         | *****  |      |

Fig. 22: Alineamiento de las secuencias de *tlr4* de de diferentes especies. Las secuencias altamente conservadas (indicado por los asteriscos (\*)).

Así mismo, al realizar un cladograma este reveló que la secuencia de *tlr4* de alpaca está más relacionada a los porcinos y bovinos (Figura 23).

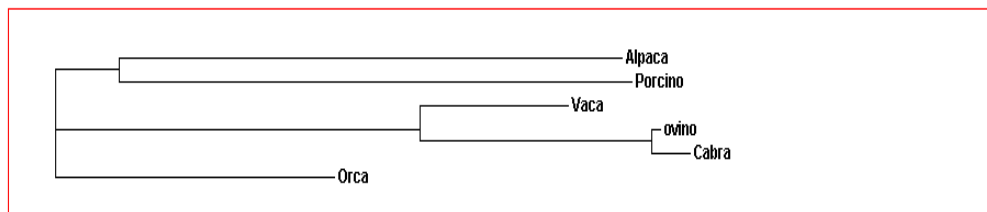


Fig. 23: Cladograma de las secuencias de *tlr4* entre especies

En relación al análisis de SNP's entre animales enfermos y sanos, estos solo estuvieron presentes en los animales que presentaron procesos neumónicos, mientras que cuatro individuos a pesar de haber sufrido de un proceso infeccioso neumónico, no mostraron SNP's en su secuencia evaluada. El polimorfismo mostro el genotipo G/T y G/C. Las secuencias de individuos fueron alineadas entre sí, observándose que eran secuencias altamente conservadas (indicado por los asteriscos (\*), lo que significa que en dicha posición los residuos son 100% idénticos (Figura 24).

```

1          -----GACCTCTCTAAGTGCCAACTGGAAACAGCTATCCCAGCGGGCATTGACCCCTC 54
Sano1     -----GACCTCTCTAAGTGCCAACTGGAAACAGCTATCCCAGCGGGCATTGACCCCTC 54
2          -----ACCTCTCTAAGTGCCAACTGGAAACAGCTATCCCAGCGGGCATTGACCCCTC 53
Sano2     -----ACCTCTCTAAGTGCCAACTGGAAACAGCTATCCCAGCGGGCATTGACCCCTC 53
3          ATCTTGGACCTCTCTAAGTGCCAACTGGAAACAGCTATCCCAGCGGGCATTGACCCCTC 60
          *****

1          ACTAAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCAATTGGATATACTTCCT 114
Sano1     ACTAAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCAATTGGATATACTTCCT 114
2          ACTAAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCAATTGGATATACTTCCT 113
Sano2     ACTAAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCAATTGGATATACTTCCT 113
3          ACTAAACTGCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAACTCTTGTCAATTGGATATACTTCCT 120
          *****

1          TATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGCCTCC 174
Sano1     TATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGCCTCC 174
2          TATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGCCTCC 173
Sano2     TATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGCCTCC 173
3          TATGAACCTCTCCGCTCCCTCCAGATTCTAGACTGCAGTTTCAATCGTATTGTGGCCTCC 180
          *****

1          AAGGAGAAAGAACTACAGCATTTGCCAAGGAGCCTCGCTTTTTTAAACCTTACTCAGAAT 234
Sano1     AAGGAGAAAGAACTACAGCATTTGCCAAGGAGCCTCGCTTTTTTAAACCTTACTCAGAAT 234
2          AAGGAGAAAGAACTACAGCATTTGCCAAGGAGCCTCGCTTTTTTAAACCTTACTCAGAAT 233
Sano2     AAGGAGAAAGAACTACAGCATTTGCCAAGGAGCCTCGCTTTTTTAAACCTTACTCAGAAT 233
3          AAGGAGAAAGAACTACAGCATTTGCCAAGGAGCCTCKCTTTTTTAAACCTTACTCAGAAT 240
          *****

1          GACTTTGCTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTC----- 279
Sano1     GACTTTGCTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTCAAGG----- 283
2          GACTTTGCTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTCAAGG----- 282
Sano2     GACTTTGCTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTCAAGG----- 282
3          GACTTTGCTTGTGTTTGTGAACACCAGCATTTCCTGCAGTGGCTCAAGGACCAG 294
          *****

```

Fig. 24: Alineamiento de las secuencias consenso de *tlr4* de 5 individuos, obsérvese la presencia de SNP's entre individuos. La letra K indica que en esa posición podría haber una G/T.

Las secuencias de ADN de los individuos fueron traducidas a una secuencias proteicas con el uso del programa Emboss Transeq, dando la secuencia aminoacídica de cada uno de los individuos. De la misma manera se realizo el alineamiento de las secuencias de la proteína. La comparación de la secuencia de aminoácidos entre especies reveló que existe gran similitud entre las proteínas de los diferentes genes de *tlr4* (Figura 25).

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| Vaca    | NSFQNNLLPDIFTELNTVLDSLKQLEQVAQTAFHSLSSIQVLNMSHNKLLSLDTFLY    | 540 |
| Ovino   | NSFQNNLLPDIFTELNTVLDSLKQLEQVSQTAFHSLPSIQVLNMSHNKLLSLDTFLY    | 454 |
| Orca    | NSFQNNLLPDIFTELNTIILDSLKQLERVSQMAFHSLPKLQVLNMSHNKLLSLDTLPY   | 540 |
| Alpaca  | -----LSKQLEQLSQRAFDPLTKLQVLNMSHNKLLSLDILPY                   | 38  |
| Porcino | NSFQNNLLPDVFTDLTNLILLDSLKQLEQVSQRAFHSLPRLQVLNMSHNRLFLDTLPY   | 540 |
|         | *****::* *.*, *****:* * * :                                  |     |
|         |  |     |
| Vaca    | EPLHSLRILDCSFNRIMASKEQELQNLPRSLTWLNTQNAFACVCEHQSFLQWVKDQRQL  | 600 |
| Ovino   | EPLHSLRILDCSFNRIMASKEQELQNLPRSLTWLNTQNAFACVCEHQSFLQWVKDQRQL  | 514 |
| Orca    | KPLHSLQILDSCFNRIEMASKEQELQHLPRSLALLNTQNDFAVCCEHQSFLQWVKDQRQL | 600 |
| Alpaca  | EPLRSLQILDSCFNRIVASKEQELQHLPRSLAFNLNTQNDFAVCCEHQSFLQWVKDQRQL | 93  |
| Porcino | KPLHSLRILDCSYNLIVASKEQELQHLPRSLAFNLTKNDFSCACEHQTFLQWVKDQRQL  | 600 |
|         | :*:*:*****: * *: *:*:*:*:*:*: *: *:*:*: * *: * *:*:*: *      |     |
|         |  |     |
| Vaca    | LVGAEQMMCAEPLDMEDMPVLSFRNATCQLSKTIISVSVTVLLVSVGVLVYKFYFHLM   | 660 |
| Ovino   | LVGAEQMMCAEPLDMKMPVLSFRNATCQMSKMIISVSVTVLLVSVGVLVYKFYFHLM    | 574 |
| Orca    | LVGAEQMMCTQPLDMQDMPVLSFRNATCQMNKMIISVSVLTILLVSVAGALVYKFYFHLM | 660 |
| Alpaca  | -----  |     |
| Porcino | LVGAEQMVCTQPLEMQDLFVLSFRNAT-----                             | 627 |

Fig. 25: Alineamiento de la secuencia *in silico* de la proteína TLR4 de alpaca con secuencias de TLR4 de otras especies. Los dos puntos (:), indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas, el punto (.), indica sustituciones menos conservativas en la secuencia evaluadas.

El cladograma de las secuencias proteicas se muestra muy similar al realizado anteriormente para las secuencias de ADN, lo que demuestra que las secuencias son concordantes a través de la evolución (Figura 26).

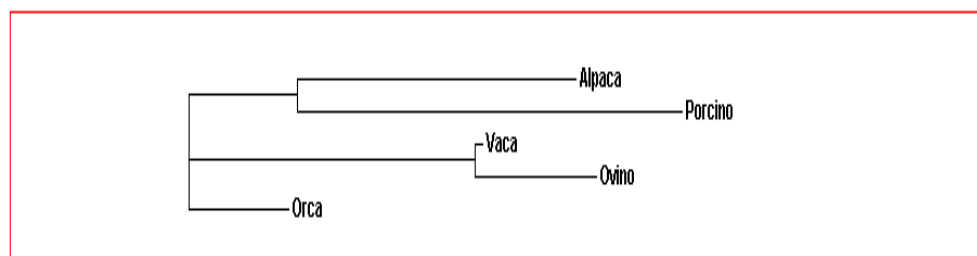


Fig. 26: Cladograma de secuencia de la proteína TLR4 entre especies.

El análisis de la composición de aminoácidos en la secuencia *in silico* de la proteína de *tlr4* de alpacas demostró que los aminoácidos presentes en mayor proporción son

Leucina, Glutamina (Figura 27). Su composición es muy similar a la composición de la proteína de porcinos y bovinos (Figura 28 y 29).

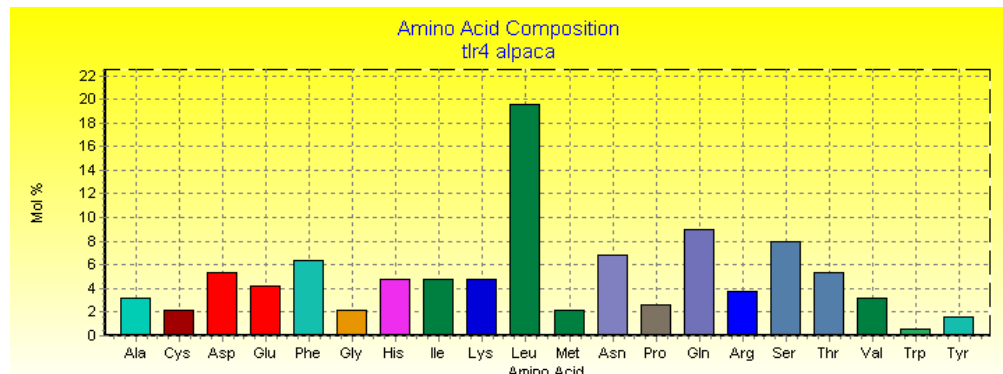


Fig. 27: Composición aminoacídica del *tlr4* de alpaca, basado en la secuencia *in silico* de la proteína

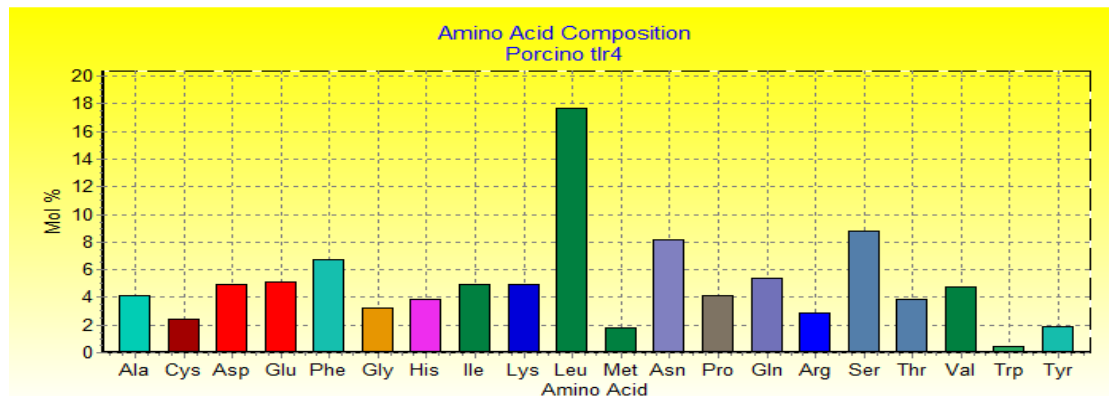


Fig. 28: Composición aminoacídica del *tlr4* de porcino, basado en la secuencia de la proteína

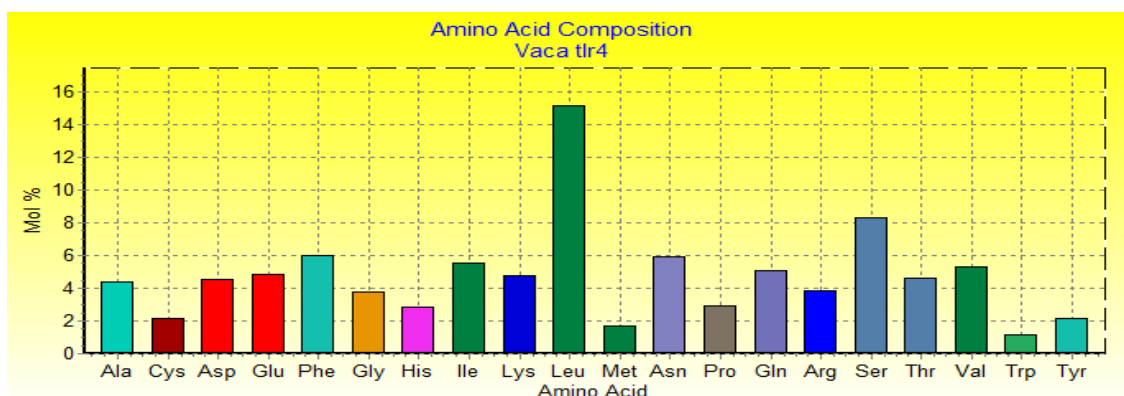


Fig. 29: Composición aminoacídica del *tlr4* de bovino, basado en la secuencia de la proteína

## 5. DISCUSIÓN

La crianza de Camélidos Sudamericanos es una de las actividades económicas más importantes para la población alto andina del Perú, sin embargo, se ve mermada debido a las diferentes enfermedades infecciosas que afectan mayormente a las crías de alpacas., siendo los procesos neumónicos en crías de alpacas son la segunda causa principal de mortalidad de estos animales (Ameghino y DeMartini, 1991).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la asociación de los procesos neumónicos con la presencia o ausencia de polimorfismos en el gen *tlr4*, para ello se identificaron bacterias Gram negativas que contengan LPS (Poltorak et al. 1998a), como *P. multocida* y *M. haemolytica*, y se identificó al BRSV debido a que la proteína F también interactúa con esta proteína (Kurt-Jones et al., 2000, Valarcher y Taylor, 2007).

Los aislamientos bacterianos revelaron que *P.multocida* se presenta con mayor frecuencia que *Mannheimia haemolytica*, mostrando concordancia con lo reportando anteriormente por Ameghino y Calle (1989) considerando a *P.multocida* como la bacteria más predominante, estando presente en 11 crías de 26 que fueron estudiados. Otros estudios incluyen a *Pasteurella haemolytica* (hoy *Mannheimia haemolytica*) como participante en estos procesos (Ameghino y DeMartini, 1991), a su vez Rosadio *et al.*, (1990) reportó la participación de *P. multocida* y *Pasteurella haemolytica* (hoy *Mannheimia haemolytica*) en neumonías agudas en alpacas en el Perú, lo cual fue observado en la mayoría de cuadros neumónicos en el estudio.

Sin embargo otros estudios revelan que otros agentes bacterianos también interactúan en los cuadros neumónicos, teniendo a *Mycoplasma sp.*, Estafilococos alfa hemolíticos, Streptococos alfa hemolíticos, *Klebsiella sp.*, *E.coli* como otros agentes bacterianos presentes en los



pulmones de 30 crías y alpacas adultas (Arratia y Herrera, 1992), en el estudio se logró identificar la participación de *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Escherichia coli*.

Se observó la coexistencia de *P. multocida* y *M. haemolytica*, junto a agentes virales como BRSV la cual ha sido reportada por Calsin (2008) y Rosadio *et al.* (2001), corroborando la posible interacción patogénica virus/bacteria en las detecciones de agentes virales y bacterianos en patologías intralesionales siendo muy semejante a otros rumiantes en el desarrollo de neumonías agudas.

Sin embargo, es importante mencionar, que adicionalmente, a pesar de no ser objetivo del trabajo y debido a las condiciones de crianza mixta (ovinos, bovinos, caballos) y a estudios serológicos previos que han demostrado la presencia de otros agentes virales: PI-3, Herpesvirus bovino tipo 1 (Rivera *et al.*, 1987; Rosadio *et al.*, 1993; Manchego *et al.*, 1998; Victorio *et al.*, 2003) en alpacas del sur del país y BAV-3 en ovinos (Martin, 1996), se realizó en paralelo la identificación de antígenos virales de PI-3 y BAV-3, logrando identificar la presencia 7 y 10 animales positivos respectivamente, corroborando que la interacción virus/bacteria se dio en 15 de los 25 casos, lo cual nos permite interpretar que las infecciones bacterianas fueron secundarias a las virales (Anexo 7 y 8).

Los pulmones que sufren alteraciones patológicas por agentes que conllevan a un cuadro neumónico pueden variar según la afección del tejido, esto dependerá de la duración del proceso infeccioso y de los agentes involucrados. Las lesiones macroscópicas halladas fueron divididas en tres grupos: bronconeumonía extensiva y pleuritis fibrinosa, bronconeumonía multilobal, congestión y edema pulmonar, siendo hallazgos que concuerdan con las lesiones reportadas anteriormente en crías de alpacas, donde los focos neumónicos indican la presencia de pasteurelosis, con la presencia de pleuritis y adherencia fibrinosa en las paredes intercostales, también los cuadros de bronconeumonía suelen ser hallazgos frecuentes junto con las congestión pulmonar (Ameghino y DeMartini, 199; Abarca y Málaga, 1986). Los hallazgos microscópicos fueron concordantes con los reportados por Calsin (2008) y Rosadio *et al.* (2001).

Las alteraciones a nivel de los bronquios suelen estar asociados a procesos virales previos a una infección bacteriana, en el cual los virus pueden generar una descamación y necrosis de epitelio y en algunos casos la hiperplasia de los mismos (Calsín, 2008). Una de las lesiones microscópicas más resaltantes fue la hiperplasia del epitelio bronquiolar, así como la descamación y necrosis del mismo (bronquiolitis necrotizante), las muestras que presentaron

este tipo de lesiones eran BRSV, las que fueron negativas a virus o no entraron al estudio de identificación viral fueron positivas a *Mannheimia haemolytica*.

Estudios anteriores han comprobado la existencia de alpacas sero-reactores a diversas especies de *Mycoplasma* (Hung *et al.*, 1988), por lo cual no se descarta que pudo existir la presencia de este patógeno en los casos estudiados, esta hipótesis se fortalece por los hallazgos de agregados linfoides peribronquiales, las cuales son características histológicas de la presencia del agente (Dungworth, 1985). Estas lesiones se evidenciaron en cuatro casos sugiriendo que podía co-existir la presencia de *Mycoplasma sp.* con *P.multocida*, *M. haemolytica* y BRSV, sin descartar la interacción con otras agentes virales y bacterianos conocidos. Lamentablemente el estudio de Hung *et al.*, (1988) no se hicieron estudios histológicos que nos ayude a determinar si existían lesiones compatibles con las halladas en estos casos.

Conocida la presencia de diferentes patógenos en las muestras evaluadas de animales enfermos, se procedió a la identificación del gen *tlr4* debido a que este interactúa con el LPS y la proteína F, los cuales están presentes en los principales agentes patógenos identificados. Sin embargo, es importante mencionar que al seguir este proceso estaríamos seguros que el receptor fue estimulado verdaderamente por los ligandos adecuados, lo cual no significa que los otros agentes involucrados hayan seguido el proceso de reconociendo de patrón por el sistema inmune activando sus respectivos receptores. Como en el caso de *Staphylococcus* activando el TLR2 (Takeuchi *et al.*, 2000) o para el mismo TLR4 si se hubiese determinado la presencia de otros agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae* (Wang *et al.*, 2002) y *Klebsiella pneumoniae* (Branger *et al.*, 2004), este ultimo reportado solo una vez en alpacas en el país (Arratia y Herrera, 1992).

Al lograr identificar el gen *tlr4* en alpacas, se demostró que esta proteína se conserva en diversas especies de animales a través de la evolución debido a que participa de manera directa en la inmunidad innata.

Sin embargo, estudios en otras especies reportan que alteraciones de un solo nucleótido en la secuencia del gen, puede conllevar a que la función de la proteína se altere generando una disminución en su respuesta al interactuar con el ligando que lo activa. Esto ha sido reportado en humanos (Arbour *et al.*, 2000) y animales (Leveque *et al.*, 2003; Shinkai *et al.*, 2006, Mariotti *et al.*, 2009). Para ello, al estudiar la secuencias del gen *tlr4* de alpacas se logró

identificar la presencia de 2 SNP's, los cuales no pudieron ser asociados con la presencia o ausencia de la enfermedad.

Estos hallazgos nos ayudan a determinar que al NO detectar polimorfismos tipo SNP en el gen *tlr4* tanto en animales enfermos y sanos, sí se logró identificar el gen *tlr4* en esta especie, lo cual deja un camino abierto para poder estudiar el gen en su máxima expresión, es decir en base a esta secuencia inicial que se ha obtenido se pueden seguir estudiando otras regiones del gen, buscando hallar polimorfismos en otros exones, o quizás en la secuencia de la región intracelular de la proteína.

Al realizar la simulación de la secuencia *in silico* de la proteína TLR4 de alpaca, eligiendo la secuencia de un animal sano se logró evidenciar, una gran similitud de la proteína TLR4 con otras especies relacionadas. Así, tanto el alineamiento de la secuencia de ADN y de proteínas, mostró un mismo tipo de cladograma, en el cual se evidencia que el *tlr4* de alpaca está más relacionado al *tlr4* de porcino, seguido por el de bovino. Además, el análisis de la proporción de aminoácidos en la secuencia *in silico* de la proteína TLR4 de alpacas mostró que la estructura de la proteína TLR4 en alpacas es muy semejante a la de porcinos, con una alta proporción de leucina y glutamina, coincidiendo con la composición de la proteína en bovinos y porcinos. Esto permite pensar que el funcionamiento de esta proteína sería similar en otras especies, y las investigaciones sobre resistencia innata en porcinos y bovinos, y podría ser extrapolado a alpacas, aunque serán necesarios más estudios.

Finalmente, aunque no se logró encontrar polimorfismos tipo SNP en animales enfermos que permitiera diferenciarlos de los sanos, (relación entre polimorfismo y enfermedad), se ha logrado determinar e identificar la presencia del gen en esta especie así como se logró implementar una metodología que permitiría realizar un estudio más amplio con un mayor número de muestras y que incluya diversas poblaciones de alpacas de diversas zonas del país. . Contar con metodología establecida permitirá desarrollar futuras investigaciones a fin de comprender mejor el rol de *tlr4*. Así se podrá contribuir (en un futuro cercano) en la identificación y selección de animales resistentes, y ser usados en programas de mejoramiento genético de poblaciones de alpacas, considerando dicha característica de resistencia

## 6. CONCLUSIONES

- La secuencia en estudio del gen *tlr4* y la estructura de la proteína TLR4 de alpacas muestra mayor similitud con las secuencias de porcino y bovino.
- Los polimorfismos G/T y G/C del gen *tlr4* de alpacas estuvieron presentes en ambos grupos de animales evaluados (sanos y enfermos) y no permitió establecer si está relacionado con la susceptibilidad o resistencia frente a enfermedades neumónicas.
- La existencia de diversos patógenos bacterianos y virales, demuestran que existe interacción de estos patógenos en los cuadros de neumonías agudas en alpacas. La identificación de BAV-3 en alpacas, permite reportar por primera vez, la presencia de este virus en alpacas.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abarca M, Málaga JL. 1986. Lesiones anatomopatológicas de hígados y pulmones de ovinos y alpacas en el camal de Santa Rosa- Melgar. En: Investigaciones en Camélidos Sudamericanos. 1963- 2003. Perú, Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 186:1522–1525
- Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Kawasaki K, Nishijima M, Hayashi S, Kimoto M & Miyake K. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species- specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 13: 1595-1599.
- Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M & Miyake K (2000) Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 164: 3471-3475.
- Akira S, Hemmi H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85(2): 85-95.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. Fourth Edition. USA: Ed. Garland Science. 464 p.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
- Ameghino E. 1990. Avances sobre investigación en salud animal Camélidos Sudamericanos. IVITA. UNMSM. Bol. Div. N° 23. 25-30 pp.
- Ameghino E. y Calle S. 1989. Aislamiento de *Pasteurella multocida* de procesos neumónicos en crías de alpaca. En: XII Reunión Científica Anual del APPA. Lima:

Asociación Peruana de Producción Animal.

- Ameghino E., DeMartini J. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. Perú: IVITA-UNMSM. 86 p.
- Ames TR., Markham RJ;F, Opuda-Asibo J, Leninger JR, Maheswaran SK. 1984. Pulmonary responses to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. Can J Comp Med. 49: 395-400.
- Anderson KV. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. Curr Opin Immunol 12: 13-19.
- Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. Cell 42: 779-789.
- Angen O, Muters R, Caugant, DA, Olsen JE, Bisgaard M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1: 67-86.
- Arbour NC, Lorenzi E, Shutte BC., Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nature genetics. Vol. 25. 187-191.
- Arons MS, Fernando L, Polayes IM. 1982. *Pasteurella multocida*: the major cause of hand infections following domestic animal bites. J.Hand Surg. Am. 7, 47-52.
- Arratia V, Herrera JP. 1992. Agentes etiológicos de las neumonías en alpacas de la Cat. Santa Lucia N° 179. En: XI Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias del Perú. Puno.
- Barsallo J. 1985. Agentes bacterianos encontrados en el aparato respiratorio de alpacas adultas aparentemente normales. Anales de la V Conven. Internac. Sobre Camel. Sudamer. 36 p.
- Basu S, Fenton MJ. 2004. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 286:L887-92.
- Bautista G, Mosqueta G. 2004. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su aplicación en la medicina veterinaria. Vet Mex.Vol 36. 453-468.
- Biberstein, EL. 1978. Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Bergan T, Norris J. Methods in Microbiology. USA: Academic Press. Inc. 253p.

- Bottcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamade U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R. 2003. Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. *Neurosci Lett* 344: 17-20.
- Bowie A, Kiss-Toth E, Symons JA, Smith GL, Dower SK, O'Neill LA. 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10162-10167.
- Boyce J, Lo RY, Wilkie I. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: Gyles C., Prescott J., Songer G., Thoen C. Pathogenesis of Bacterial Infections Animals. USA: Blackwell Publishing. 285-294 p.
- Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, Florquin S, van der Poll T. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun*. 2004;72:788-94.
- Bryson D.E. 1993. Necroscopy findings associated with BRSV pneumonia, *Vet. Med.* 88:894–899.
- Bulut Y, Faure E, Thomas L, Equils O, Arditi M. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* 167: 987-994.
- Burzyn D, Rassa JC, Kim D, Nepomnaschy I, Ross SR, Piazzon I. 2004. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* 78:576–584
- Calsín E. 2008. Identificación de agentes virales y bacterianos causantes de neumonías agudas en crías de alpacas. Tesis de médico veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48-69 p.
- Cao Z, Henzel WJ, Gao X. 1996a. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271: 1128-1131.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. 1996b. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383: 443-446.
- Capitini CM, Herrero IA, Patel R, Ishitani MB, Boyce TG. 2002. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis* 34: e74–e76.
- Cargill EJ, Womack JE. 2007. Detection of polymorphisms in bovine Toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics*. 89:745–55.
- Caroff M, Karibian D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 338(23): 2431-2447.

- Carpenter S, O'Neill LA. 2007. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol* 9(8): 1891-1901.
- Carter GR. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Adv.Vet.Sci.* 11, 321-379.
- Chanter N, Rutter J M. 1989. Pasteurellosis in pigs and the determinants of virulence of toxigenic *Pasteurella multocida*. In: Adlam C, Rutter JM. *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press. 161- 195 p.
- Chaudhary PM, Ferguson C, Nguyen V, Nguyen O, Massa HF, Eby M, Jasmin A, Trask BJ, Hood L, Nelson PS. 1998. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91: 4020-4027.
- Chávez, C. J.1985. Contribución al estudio de las neumonías en becerros *Holstein Friesian* en un centro de recría. *Tesis licenciatura*. México: UNAM
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 274:10689-92.
- Christensen H, Angen O, Olsen JE, Bisgaard M. 2004. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology* 150, 1757- 1767.
- Christensen H, Bisgaard M, Angen O, Frederiksen W, Olsen JE. 2005. Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J.Clin.Microbiol.* 43, 259-270.
- Chuang TH, Ulevitch RJ. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11: 372-378.
- Chuang T, Ulevitch RJ. 2001. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518: 157-161.
- Colín RF, Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo FJ, Merino MM.1987. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos de México. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 29: 231-234.
- Collins PL, Mottet G. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72 ( Pt 12), 3095-101.



- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. 2001. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa.
- Coutinho A, Forni L, Melchers F, Watanabe T. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. Eur J Immunol 7: 325-328.
- da Silva CJ, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem 276: 21129-21135.
- Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. 2008. Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. Animal Health Research Reviews 8(2); 129–150
- Davies DH, Jones BA, Thurley DC. 1981. The pathogenesis of sequential infection with Parainfluenza virus type 3 and PASTEURELLA haemolytica in shepp. Vet. Microb. 6: 173-182.
- De Alwis MCL. 1992. Pasteurellosis in Production Animals: A Review. In: Patten BE, Spencer TL, Johnson RB, Hoffman D, Lehane L. Pasteurellosis in Production Animals, USA: ACIAR Proceedings. 11-18p.
- Domachowske JB, Rosenberg HF. 1999. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin Microbiol Rev 12(2): 298-309.
- Donachie W. 2000. Bacteriology of bovine respiratory disease. Cattle Pract. 8: 5-7.
- Dowling A, Hodgson JC, Donachie W, Eckersall PD, Sales J. 2004. Pathophysical and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalin-killed *Pasteurella multocida* biotype A: 3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. Vet Immunol Immunopathol. 100 (3-4): 197-207
- Doyle SE, O'Connell R, Vaidya SA, Chow EK, Yee K, Cheng G. 2003. Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than toll-like receptor 4. J Immunol 170: 3565-3571.
- Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 11: 362-371.
- Dungworth DC. 1985. The respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of Domestic Animals. USA: Academic Press, pp. 448–489.
- Easton A, Domachswake J, Rosenberg H. 2004. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis." Clin Microbiol Rev 17(2): 390-412.
- Ewers C, Lubke-Becker A, Bethe A, Kiessling S, Filter M, Wieler LH. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol 114(3-4): 304-317.

- Fan J, Malik AB. 2003. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 9: 315-321.
- Fowler M. 2010. *Medicine and Surgery of Camelids*. 3<sup>th</sup> Edition. USA: Wiley-Balckwell.339-349 p.
- Frank GH. 1982. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the midwestern United States. *Am J. Vet. Res.* 43:2035-2037.
- Frank GH, Smith PC. 1983. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res.* 44:981-985.
- Frank GH. 1986. *Pasteurella haemolytica* and respiratory disease in cattle. *Proc. 89<sup>rd</sup>. Annual Meeting United States Animal Health Association, San Diego, California*, pp. 153-160, 1-79.
- Frank GH. 1989. Pasteurellosis of Cattle. In: Adlam C, Rutter JM. *Pasteurella and Pasteurellosis* London: Academic Press Limited.
- Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. 2006. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest* 18(1): 18-28.
- Garmendia A, Palmer G, DeMartini J, McGuire T. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer: A major determinant of mortality in newborn alpacas (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* Vol. 48, N<sup>o</sup>2. Pag. 1472- 1476.
- Gay NJ, Keith FJ. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355–356.
- Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. 2006. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 290:G1157–63.
- Gilmour NJ. 1978. Pasteurellosis in sheep. *Vet. Rec.* 102, 100-102.
- Gilmour NJ, Turner G, Berman, RG, Krenzer AK. 1978. Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes. *Appl Environ Microbiol* 35(1): 84-88.
- Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG. 1989. Experimental *Pasteurella multocida* pneumonia in calves. *Res Vet Sci* 47(2): 185-189.
- Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. 2002. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168: 5989-5992.

- Guttmacher AE, Collins FS. 2002. Genomic medicine – a primer. *N Engl J Med*.347:1512-20.
- Hacks W. 2001.The Peruvian Alpaca Meat and Hide Industries. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 11 p.
- Hagberg H, Peebles D, Mallard C. 2002. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic- ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 30- 38.
- Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. 2001. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 50: 315-321.
- Hamann L, Schumann RR, Flad HD, Brade L, Rietschel ET, Ulmer AJ. 2000. Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF-kappaB activation. *Eur J Immunol* 30:211–216
- Haritani M, Narita M, Murata H, Hashimoto K, Takizawa T. 1989. Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by *Pasteurella multocida* in calves. *Am J Vet Res* 50(12): 2162-2167.
- Hartel H, Nikunen S, Tanskanen R, Kivelä S, Aho P, Soveri T, Saloniemi H. 2004. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Vet Scand* 45(3-4): 193-200.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269–279.
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ. 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaires' disease. *J Exp Med*; 198: 1563–72.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.
- Heddleston KL. 1976. Physiologic characteristics of 1,268 cultures of *Pasteurella multocida*. *Am.J.Vet.Res.* 37, 745-747.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.
- Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284: 316-320.

- Hultmark D. 1994. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 144-146.
- Hung A, López T, Perales R, Noé N. 1988. Mycoplasmosis en camélidos sudamericanos. XI Congreso Panamericano de Cienc. Vet. Lima, Perú. 63 p.
- Jacques M, Rioux S, Paradis SE, Begin C, Gottschalk M. 1996. Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. *Can J Microbiol* 42(8): 855-858.
- Janeway CA, Jr, Medzhitov R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10: 349-350.
- Jaramillo L, Aguilar F, Trigo F. 1987. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet. Mex.* 18: 185-188.
- Jawets E. 2002. Microbiología médica. 17ª edición. México: El manual moderno. 171-172, 317 p.
- Jericho KW, Carter GR. 1985. Penumonia in calves produced with aerosols of *P. multocida* alone and in combination with Bovine hepesvirus 1. *Can J Com Med* 49:138-144.
- Johnson GB, Brunn GJ, Tang AH, Platt JL. 2003. Evolutionary clues to the functions of the Toll like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* 24: 19-24.
- Kimberling CV, Jenses R.; Swift B. 1988. Diseases in sheep. 3<sup>th</sup> Edition. USA: Lea and Febiger 173-181 p.
- Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG. 2002. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll like receptors? *Chest* 121: 1329-1336.
- Köhler - Rollefson, Mundy P, Mathias E. 2001. A field Manual on Camel Diseases. Tradicional and modern health care for dromedary. London: ITDG Publishing. 127-130 p.
- Koneman EW, allen SD, Janda WM, Schereckenberger PC, Winn WC. 1999. Diagnostico microbiologico. 5<sup>ta</sup> ed. Argentina: Ed. Panamericana. 410-413 p.
- Krause T, Bertschinger HU, Corboz L, Mutters R. 1987. V-factor dependent strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]* 266, 255-260.
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. 2000. Pattern recognition

receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus, *Nat. Immunol.* 1:398–401.

- Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, Riva A, Ramoni M, Martinez FD, Weiss ST, Kwiatkowski DJ. 2002. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 190:9–25
- Lea-Master BR, Evermann JF, Lemkuhl HD. 1987. Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootia of respiratory tract disease in recently weaned lambs. *J. Am. Vet. Med.* 190: 1545-1547.
- Lee J, Freverth C, Matute-Bello G, Wurfel M, Wong V, Lin S., Ruzinski J, Mongovin S, Goodman R, Martin T. 2005. TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in *E.coli* pneumonia. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*
- Leimatre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J. 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spa<sup>-</sup> tzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, Vol. 86, 973–983
- Leite F, Gyles S, Atapattu, D, Maheswaran SK, Czuprynski CJ. 2003. Prior exposure to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin or LPS enhances beta(2)-integrin expression by bovine neutrophils and augments LKT cytotoxicity. *Microb Pathog* 34(6): 267-275.
- Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith A, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Ostí JC, Morgan K, Malo D. 2003. Allelic Variation in TLR4 Is Linked to Susceptibility to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Chickens. *Infection and Immunity*. Vol. 71, No. 3.. 1116-1124.
- Li Q, Lu Q, Hwang JY, Buscher D, Lee KF, Izpisua-Belmonte JC, Verma IM. 1999. IKK1 deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* 13: 1322-1328.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274: 33419-33425.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. 1998. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser- 176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3792-3797.
- Lopez A. 2007. Respiratory system. In: McGarvin MD, Zachary JF. *Pathological Basis of Veterinary Disease USA*: Mosby Elsevier. 522–523 p.
- López C. 1993. Estudio macro y microscópico del pulmón de alpaca. Tesis Fac. Med. Y Zoot. Universidad Nacional del Altiplano- Puno – Perú

- López A, Maxie MG, Savan M, Ruhnke HL, Thomson RG, Barnum DA, Geissinger HD. 1982. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhea or *Mycoplasma bovis*. Can J. Comp. Med. 46: 302-306.
- Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. Oncogene 5: 1095-1097.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Scharz DA. 2000. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infection and Immunity 68:6398-401.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA (2002) Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. Arch Intern Med 162:1028–1032
- Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. PLoS ONE 2007;2:e1318.
- Ma Z, Li J, Yang L, Mu Y, Xie W, Pitt B, Li S. 2004. Inhibition of LPS- and CpG DNA- induced TNF- $\alpha$  response by oxidized phospholipids. AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Vol. 286. 1808-1816.
- Maclachlan NJ; Dubovi EJ; Fenner F. 2011. Fenner's Veterinary virology. India: Elsevier INC. 137-142 p.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. 1997. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. Nature 385: 540-544.
- Mancek M, Pristovsek P, Jerala R. 2002. Identification of LPS-binding peptide fragment of MD2, a toll-receptor accessory protein. Biochem Biophys Res Commun 292: 880-885.
- Manchego A, Rivera H, Rosadio R. 1998. Seroprevalencia de agentes virales en rebaño mixto de una comunidad andina peruana. Rev Inv PEC. IVITA N° extraordinário 9 (2): 1-10
- Manning PJ, DiGiacomo RF, DeLong D. 1989. Pasteurellosis in Laboratory Animals. In: Adlam C, Rutter JM. Pasteurella and Pasteurellosis. London: Academic Press. 263–302 p.
- Mansell A, Reinicke A, Worrall DM, O'Neill LA. 2001. The serine protease inhibitor antithrombin III inhibits LPS-mediated NF- kappaB activation by TLR-4. FEBS Lett 508: 313317.
- Mariotti M, Williams JL, Dunner S, Valentini A, Pariset L. 2009. Polymorphisms within the Toll-Like Receptor (TLR) -2, -4, and -6 Genes in Cattle. Diversity. 1, 7-18.

- Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD, Kwok PY. 2001. Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they? *Nat Genet*; 27: 371–72.
- Martin W. 1996. Respiratory infections of sheep. *Com. Inmun. Microbiol. Infect.Dis.* 19 (3): 171-179.
- Martin W.B. 2000. Enfermedades de la Oveja. 2<sup>da</sup> Edición España: Acribia S.A.. 213-217, 231-243 p.
- Masot AJ, Gomez-Tejedor C, Gomez L, Gazquez A, Redondo E. 1996. Pathological study of experimentally induced bovine respiratory syncytial viral infection in lambs. *Zentralbl Veterinarmed B* 43(4): 233-243.
- Mathy NL, Mathy JP, Lee RP, Walker J, Lofthouse S, Meeusen E. N. 2002. Pathological and immunological changes after challenge infection with *Pasteurella multocida* in naive and immunized calves. *Vet Immunol Immunopathol* 85(3-4): 179-188.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997a. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997b. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1998. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol*, 10(1): p. 12-5.
- Melo M. 1997. Sistemas de control y manejo sanitario de alpacas y llamas en la región del sur peruano. 1<sup>era</sup> ed. FMVZ-UNA. Puno-Perú. *Rev Inv Vet Perú* 2004; 15 (2): 127-131
- Menzies M, Ingham A. 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109, 23–30
- Merchant IA, Pecker AA. 1994. *Bacteriología y Virología Veterinarias*. España: Acribia. In: Yers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. USA: American Society for Microbiology. 348 p.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science* 278: 860-866.
- Merino S, Rubires X, Aguillar A, Guillot JF, Tomas JM. 1996. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb Pathog* 20(6): 325-333.

- Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. 2006. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. Vol. 25 / Núm 2/ Abril-Junio : 115-130
- Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP. 2003. Induction of macrophage nitric oxide production by gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric toll-like receptor 5/toll-like receptor 4 complexes. *J Immunol* 170: 6217-6223.
- Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Carter AB, Gudmundsson G, Hunninghake GW. 2003. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin, *J. Biol. Chem.* 278:53035–53044.
- Morisato D, Anderson KV. 1995. Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu Rev Genet* 29: 371-399.
- Mosier DA. 1997. Bacterial pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(3): 483-493.
- Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL- 1 signaling. *Science* 278: 1612-1615.
- Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A. 2000. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 67: 450-456.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164: 558-561.
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. 2003. MD-2 Is Necessary for the Toll-Like Receptor 4 Protein To Undergo Glycosylation Essential for Its Translocation to the Cell Surface. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 405-410.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276: 10229-10233.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-13771.
- Peixoto P, Mota R, Brito M, Corbellini L, Driemer D, De Souza M. 2000. Infecção natural pelo Virus sincicial respiratório bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. *Pes. Vet.BRas.* 20(4).



- Perales R, Tabacchi L, Chavera A, López T, Nieves S, Santillan G, Pezo D, Palacios C. 2006. Determinación macro y micro de lesiones pulmonares como causa de mortalidad en crías de alpacas. En: XXIX Reunión Científica Anual APPA. Perú, Huancayo.
- Pereira JP, Girard R, Chaby R, Cumano A, Vieira P. 2003. Monoallelic expression of the murine gene encoding Toll-like receptor 4. *Nat Immunol* 4: 464-470.
- Petersen KD, Christensen JP, Bisgaard M. 1998. Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. *Zentralbl.Bakteriol.* 288, 1-12
- Piojan P, Aguilar F, Morales F. 1999. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet. Mex.* 30 (2): 149-155.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B & Beutler B. 1998a. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN & Beutler B. 1998b. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24: 340-355.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. India: Blackwell Science. 137-142 p.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. 1999. Endotoxintolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189: 615-625.
- Radostis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Vol. I, 9<sup>na</sup> ed. España: Mc GrawHill, 522 p.
- Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.
- Ramdani, Adler B. 1991. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. *Vet Microbiol* 26(4): 335-347.
- Ramírez A. 1989. Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. XII Reunión científica anual APPA. Libro de resumen. Lima, Perú. 85 p.

- Ramírez A, 1991. Enfermedades infecciosas. In: Fernández-Baca, S. (Ed.), Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. FAO, Santiago de Chile, 263–324 p.
- Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2281–2286
- Rebhum WC. 1995. Enfermedades del ganado vacuno lechero. España: Acribia S.A. 87-135 p.
- Rehmtulla A J, Thomson RG. 1981. A review of the lesion in shipping fever of cattle. *Can. Vet. J.* 22:1-18.
- Rhee SH, Hwang D. 2000. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 275: 34035-34040.
- Rimler RB, Glisson JR. 1997. Fowl cholera. In *Diseases of Poultry*. W.Calnek, H.J.Barnes, C.W.Beard, L.R.McDougald and Y.M.Saif (eds.) .Ames, Iowa State University Press. 143-159.
- Rivera H, Madewell B, Ameghino E. 1987. Serological survey of viral antibodies in peruvian alpacas (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* (48), 2: 189-191.
- Rock FL, Hardiman G., Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:588–593.
- Rodríguez de Castro F, Solé-Violán J, Rodríguez-Gallego JC. 2005. Variabilidad genética en la susceptibilidad y en la gravedad de la neumonía. *Arch Bronconeumol.* 2005;41(Supl 5):21-9
- Rodríguez H, Mimbela M. 1981. Microbiología de secreción nasal y bucal de alpacas. Resúmenes de proyectos de investigación realizados por la UNMSM. Periodo 1980-1981. Tomo III.
- Rosadio R, Ameghino E, Ramírez A. 1990. Diagnosis and control of diseases in sheep and alpaca in Peru. En: *Improving Andean sheep and alpaca production*. Mc Corkle CM (Ed). University of Missouri-Columbia Printing Services, pp 141-220.
- Rosadio R, Crilo E, Manchego A, Rivera H. 2011. Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Res.* doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.02.001

- Roy JH. 1990. Respiratory infections. In: Roy JH. The Calf, Management of Health, London: Butterworth. 132-153 p.
- Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, Li X, Lukacs NW. 2005. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression, *J. Virol.* 79:3350–3357.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 860–910.
- Schiefer B, Ward GE, Moffat RE. 1978. Correlations of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. *Vet. Pathol.* 15 :313- 321.
- Schroder NW, Hermann C, et al. 2003. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 81(6): 368-372.
- Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 194: 79-88.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-1431.
- Seabury CM, Cargill EJ, Womack JE. Sequence variability and protein domain architectures for bovine Toll-like receptors 1, 5, and 10. *Genomics.* 2007;90:502–15.
- Sebastiani G, Leveque G, Lariviere L, Laroche L, Skamene E, Gros P, Malo D. 2000. Cloning and characterization of the murine toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in Salmonella-susceptible MOLF/Ei mice. *Genomics* 64: 230-240.
- Sharp I. 1983. Acute respiratory virus infections. En: Diseases of sheep. Edit. W. Balackwell, Sci. Publ. Pág. 8-12
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782.
- Shinkai H, Tanaka M, Morozumi T, Eguchi-Ogawa T, Okumura N, Muneta Y, Awata T, Uenishi H. 2006. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics.* N° 38. 324-330.

- Silverman N, Maniatis T. 2001. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15: 2321-2342
- Smiley ST, King JA, Hancock WW. 2001. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167: 2887-2894.
- Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C & Beutler B (2000) Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biol* 1: RESEARCH002.
- Sneath P H, Stevens M. 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 40, 148-153.
- Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. 1991. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* 65, 4063-9.
- Stewart I, P. J. Schluter, et al. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ Health* 5: 7.
- Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. 1996. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med*; 24: 381–84.
- Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steinstraesser L, Alarcon WH, Remick DG, Wang SC. 2000. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* 31: 932-936.
- Sultz BM. 1968. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. *Nature* 219: 1253-1254.
- Szabo C. 2003 Role of flagellin in the pathogenesis of shock and acute respiratory distress syndrome: therapeutic opportunities. *Crit Care Med* 31: S39-S45.
- Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N, Akira S. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK $\alpha$ . *Science* 284: 3133-16.
- Takeda K, Akira S. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5(3): 143-153.
- Takeda K; Akira S. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 6, 733-742.

- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999a. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933- 940.
- Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. 1999. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231: 59-65.
- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165(10): 5392-5396.
- Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Hourri S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. 2004. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis*;189:2057–2063.
- Tapia M, Málaga J. 1989. Determinación macro-microscópica de las neumonías neonatales de alpacas (*Lama pacos*). *Resum. De Investig. 1980-89. UNA-Fac. Med. Vet. Zoot. Puno, Perú.* 15 p.
- Taylor G, Bruce C, Barbet AF, Wyld SG. 2005. Thomas L.H., DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves, *Vaccine* 23:1242–1250.
- Taylor G, Thomas LH, Furze JM, Cook RS, Wyld SG, Lerch R, Hardy R, Wertz GW. 1997. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions, *J. Gen. Virol* 78:3195–3206.
- Taylor G, Thomas LH, Wyld SG, Furze J, Sopp P, Howard CJ. 1995. Role of T lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves, *J. Virol.* 69:6658–6664.
- Tegtmeier C, Uttenthal A, et al. 1999. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralbl Veterinarmed B* 46(10): 693-700.
- Thomas LH, Cook RS, Wyld SG, Furze JM, Taylor G. 1998. Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus, *J. Infect. Dis.* 177:874– 880.

- Thomas LH, Stott EJ, Collins AP, Jebbett J. 1984. Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus, Br. J. Exp. Pathol. 65:19–28.
- Thompson DA, Fraser J, Gilmour NJ. 1977. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in ovine pasteurellosis. *Res. Vet. Sci*, 22:130-131.
- Tizard R I. 2002. Inmunología Veterinaria. 6<sup>ta</sup> Edición. México: Mc Graw Hill. 1-2 p.
- Triantafilou K, Triantafilou M. 2004. Coxsackievirus B4- induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. *J Virol* 78:11313–11320
- Trigo F, Cervantes OR, Hernández GL, Ontiveros LC. 1979. Patología, bacteriología y micología de pulmones normales y neumónicos de bovinos. *Tee. Pee. Mex.* 37:15-21.
- Trigo FJ, Romero MJ. 1986. La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Méx.* 17:116-119.
- Trigo 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria* 4: 1-37.
- Tsai KS, Thomson RG. 1975. "Bovine parainfluenza type 3 virus infection: ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract." *Infect Immun* 11(4): 783-803.
- Uematsu S, Akira S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med.* Vol 84. 712-725.
- Valarcher JF, Taylor G. 2007. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* 38(2): 153-180.
- Valentova V, Psikal I, Kovarcik K. 2003. Demonstration of bovine respiratory syncytial virus RNA in peripheral blood leukocytes of naturally infected cattle. *Acta Virol* 47(1): 33-36.
- Victorio W, Rosadio R, Rivera H, Manchego A. 2003. evidencias serológicas de virus neumotrópicos en alpacas de la provincia de Cuzco, Cuzco. *Rev Inv Vet Perú* 2004; 15 (2): 127-131
- Viera R, Sato A, Nuñez Q. 1968. Los pulmones y la arborización bronquial en la alpaca (*Lama pacos*). *Revista de la Fac. Med. Vet. UNMSM.* Vol 22. Lima
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA & Segal DM. 2001. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12156-12161.
- Viuff D, Greve T, Holm P, Callesen H, Hyttel P, Thomsen PD. 2002. Activation of the ribosomal RNA genes late in the third cell cycle of porcine embryos. *Biol Reprod* 66(3): 629-634.

- Walsh EE, Hruska JF. 1983. Identification of the virus-specific proteins of respiratory syncytial virus temperature-sensitive mutants by immunoprecipitation. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 202-6.
- Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. 2002. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol.*;168:810-5.
- Weekley LB, Tech V, Eyre P. 1998. Bovine Pneumonic *Pasteurellosis*. Part I. Pathophysiology. Vol. 20. N° 1.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7: 837-847.
- Westling K, Farra A, Cars B, Ekblom A G, Sandstedt K, Settergren B, Wretling B, Jorup C. 2006. Cat bite wound infections: a prospective clinical and microbiological study at three emergency wards in Stockholm, Sweden. *J.Infect.* 53, 403-407.
- Wheeler JC, Russel AJ, Stanley HF. 1992. A measure of loss: prehispanic llama and alpaca breeds. *Arch. Zootec.* 41 (extra): 467-475.
- Wheeler, JC. 1991. Origen, evolución y estatus actual. En: Avances y perspectivas de los conocimientos de los camélidos sudamericanos. Fernandez-Baca S. 1991. FAO. Chile.
- White SN, Taylor KH, Abbey CA, Gill CA, Womack JE. 2003. Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:10364–9.
- Wijewardana TG, Sutherland AD. 1990. Bactericidal activity in the sera of mice vaccinated with *Pasteurella multocida* type A. *Vet Microbiol* 24(1): 55-62.
- Wikse SE, Baker JC. 1996. The bronchopneumonias. In: Smith BP. *Large Animal Internal Medicinen*, 2. ed. USA: Mosby. 632-650 p.
- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. 1997. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278: 866-869.
- Worthen GS, Haslett C, Smeldy LA, Rees AJ. 1986. Lung vascular injury induced by chemotactic factors: Enhancement by bacterial endotoxins. *Fed. Proc.* 45 :7-12
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK. 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165: 7125-7132.

- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, *et al.* 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626–1629.
- Yates WD. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp Med.* 46:225~263.
- Ye X, Avendano S, Dekkers JC, Lamont SJ. 2006. Association of twelve immunerelated genes with performance of three broiler lines in two different hygiene environments. *Poult Sci*;85:1555–69.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91: 243-252.
- Zarembek KA, Godowski PJ. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168: 554-561.
- Zhang DX, Hewitt GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 2003; 12: 563–84.
- Zhang G, Ghosh S. 2001. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107: 13-19.
- Zhou H, Hickford JG, Fang Q, Lin YS. 2007. Allelic variation of the ovine Toll-like receptor 4 gene. *Dev Comp Immunol*;31:105–8.
- Zhou H, Hickford JG. 2008. Polymorphism of Toll-like receptor 9 (TLR9) gene in sheep. *Vet Immunol Immunopathol*; 121:140–3.



## APÉNDICE 1

### Diferenciación de *Pasteurella multocida* y *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica*

|                                   | <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Mannhemia (Pasteurella) haemolytica</i> |
|-----------------------------------|------------------------------|--|
| Hemólisis en agar sangre          | -                            | +  |
| Crecimiento en Agar Mc Conkey     | -                            | +  |
| Olor distintivo de las colonias   | +                            | -  |
| Producción de Indol               | +                            | -  |
| Actividad Catalasa                | +                            | +  |
| Actividad Ureasa                  | -                            | -  |
| Actividad Ornitina Descarboxilasa | +                            | -  |
| Producción de Acido:              |                              |  |
| Lactosa                           | -                            | +  |
| Sucrosa                           | +                            | +  |
| D-trialosa                        | v                            | -  |
| L-arabinosa                       | v                            | -  |
| Maltosa                           | -                            | +  |
| D-xylosa                          | v                            | +  |

+: mayoría de colonias positivas

-: mayoría de colonias negativas

V: reacciones variables

(Modificado de Quinn *et al.*, 2002)

## APÉNDICE 2

### Características Bioquímicas de *Pasteurella multocida*

|                   | <i>Desarrollo<br/>en agar</i> |                |                 |                  |              |               |            | <i>Producción de ácido a partir de</i> |             |            |            |             |            |             |             |             |            |
|-------------------|-------------------------------|----------------|-----------------|------------------|--------------|---------------|------------|--|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                   | <i>Hemólisis</i>              | <i>Oxidasa</i> | <i>Catalasa</i> | <i>Mc Conkey</i> | <i>Indol</i> | <i>Ureasa</i> | <i>ODC</i> | <i>Glu</i>                             | <i>Malt</i> | <i>Lac</i> | <i>Xil</i> | <i>Mntl</i> | <i>Tre</i> | <i>Arab</i> | <i>Sorb</i> | <i>Dulc</i> | <i>Gal</i> |
| Subesp. Multocida | -                             | +              | +               | -                | +            | -             | +          | +                                      | -           | -*         | V          | +           | V          | -           | +           | -           | +          |
| Subesp. septica   | -                             | +              | +               | -                | +            | -             | +          | +                                      | -           | -*         | +          | +           | +          | -           | -           | -           | +          |
| Subesp. Gallicida | -                             | +              | +               | -                | +            | -             | +          | +                                      | -           | -*         | +          | +           | -          | V           | V           | +           | +          |

\* Raras cepas pueden ser lactosa-positivas.

ODC: ornitina carboxilasa, Glu: glucosa, Malt: maltosa, Lac: lactosa, Xil: xilosa, Mntl: manitol, Tre: trealosa, Arab: arabinosa, Sorb: sorbitol, Dulc: dulcitol, Gal: galactosa.

(Tomado de Koneman, 1999)

### APÉNDICE 3

Cuadro1: Tabla de lectura de resultados del sistema API 20NE

| Test        | Actividad del Ingrediente                    | Reacción / Enzima  | Resultados                        |                             |
|-------------|--|--|-----------------------------------|-----------------------------|
|             |  |  | Negativo                          | Positivo                    |
| <b>NO3</b>  | Nitrato de potasio                           | Reducción de nitratos a nitritos                                       | Sin color                         | Rosado-rojo                 |
|             |  | Reducción de nitratos a nitrógeno                                      | Rosado                            | Sin color                   |
| <b>TRP</b>  | L-triptofano                                 | Producción de indol  | Sin color, verde pálido, amarillo | Rosado                      |
| <b>GLU</b>  | D-glucosa                                    | Fermentación de glucosa  | Azul a verde                      | Amarillo                    |
| <b>ADH</b>  | L-arginina                                   | Arginina DiHidrolasa   | Amarillo                          | Naranja/Rosado/Rojo         |
| <b>URE</b>  | Urea   | Ureasa   | Amarillo                          | Naranja/Rosado/Rojo         |
| <b>ESC</b>  | Esculina, citrato ferrico                    | Hidrólisis ( $\beta$ -glucosidasa)(Esculina)                           | Amarillo                          | Verde/Marrón/Negro          |
| <b>GEL</b>  | Gelatina (origen bovino)                     | Hidrólisis (Proteasa)(Gelatina)  | No difusión de pigmento           | Difusión del pigmento negro |
| <b>PNPG</b> | 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidasa | $\beta$ -galactosidasa(Paranitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidasa) | Sin color                         | Amarillo                    |
| <b>GLU</b>  | D-glucosa                                    | Asimilación (Glucosa)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>ARA</b>  | L-arabinosa                                  | Asimilación (Arabinosa)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>MNE</b>  | D-manosa                                     | Asimilación (Manosa)   | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>MAN</b>  | D-manitol                                    | Asimilación (Manitol)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>NAG</b>  | N-acetil-glucosamina                         | Asimilación (N-acetil-glucosamina)                                     | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>MAL</b>  | D-maltosa                                    | Asimilación (Maltosa)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>GNT</b>  | Gluconato de potasio                         | Asimilación (Gluconato de Potasio)                                     | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>CAP</b>  | Acido Caprico                                | Asimilación (Acido Caprico)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>ADI</b>  | Acido adípico                                | Asimilación (Acido adípico)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>MLT</b>  | Acido málico                                 | Asimilación (Acido málico)   | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>CIT</b>  | Citrato trisódico                            | Asimilación (Citrato trisódico)  | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>PAC</b>  | Acido fenilacético                           | Asimilación (Acido fenilacético)                                       | Transparente                      | Opaco                       |
| <b>OX</b>   |  | Citocromo oxidasa  |                                   |                             |

## **APÉNDICE 4**

### **Protocolo de Diagnostico de antígenos virales por Inmunofluorescencia**

1. Colocar las secciones de tejido en el criostato por 20 minutos y cortar el tejido con un grosor de 6  $\mu\text{m}$ .
2. Colocar los cortes de tejido en una lámina portaobjetos, dejar secar a temperatura ambiente por un lapso mínimo de 30 minutos.
3. Fijar las secciones de tejido en las láminas portaobjetos durante 20 minutos en acetona-metanol (75/25) en la sala de temperatura, en refrigeración por un periodo de 10 minutos. Retirar y dejar secar a temperatura ambiente.
4. Colocar 25 $\mu\text{l}$  – 40  $\mu\text{l}$  de conjugado sobre la muestra de tejido fijada a la lámina, procurando esparcir el conjugado sobre toda la muestra.
5. Incubar en una cámara húmeda por 30 minutos a 37 ° C.
6. Retirar el exceso de conjugado con movimientos fuertes de la lámina. Lavar suavemente la lamina con Buffer Ringer a pH 9.0.
7. Dejar en remojo la lamina por 3 minutos, retirar y repetir 3 veces. Entre cada lavado cambiar el buffer del recipiente.
8. Secar la lamina a temperatura ambiente y retirar los excesos del mismo con ayuda de papel toalla.
9. Aplicar líquido de montaje sobre el tejido fijado y colocar la lámina cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
10. Realizar la lectura en un microscopio de inmunofluorescencia.

## APÉNDICE 5

### Protocolo de purificación de productos de PCR y ADN de geles de agarosa

#### Materiales, soluciones y equipos

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Baño maría a 50-65°C
- Materiales para hacer electroforesis en gel de agarosa
- Micropipetas y puntas de diferentes volúmenes
- Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System- Promega

#### Procedimiento

1. Pesar los tubos de microcentrífuga en los que se colocarán los pedazos de gel con el producto de PCR a purificar antes y luego de agregar el pedazo y anotar la diferencia de peso.  
Nota: el pedazo de gel puede ser conservado de 4 a - 20 °C en un tubo de microcentrífuga cerrado por hasta una semana.
2. Agregar al tubo con el pedazo de gel 10 uL de la solución de unión a la membrana (Membrana Binding Solution) por cada 10 mg de pedazo de gel.
3. Vortexear la mezcla e incubarla por 1 min. a 50-65 °C o hasta que el gel se disuelva completamente. Vortexear cada cierto tiempo para disolver el gel. Asegurarse de que todo el contenido esté en el fondo del tubo, centrifugar brevemente si es necesario.  
Nota: Mezclar por inversión si el fragmento es mayor a 5 kb.
4. Colocar la columna en un tubo de colección, agregar la mezcla del gel disuelto o la mezcla de PCR e incubar por 1 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 14,000 rpm por 1 min. Descartar el líquido del tubo de colección y colocar la columna en el mismo tubo.
6. Lavar la columna agregando 700 uL de la solución de lavado de membrana (Membrana Wash Solution), centrifugar por 1 min a 14,000 rpm. Descartar el líquido del tubo de colección y colocar la columna en el mismo tubo.
7. Repetir el lavado con 500 uL de la solución de lavado y centrifugar la columna ensamblada por 5 minutos a 14, 000 rpm. Evitar que el líquido toque el fondo de la columna.
8. Vaciar el líquido del tubo de colección, reensamblar la columna al tubo de colección y centrifugar por 1 minuto para evaporar el etanol residual.
9. Transferir con cuidado la columna a tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y agregar 50-15 uL de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta del tip. Asegurarse de que toda la membrana este cubierta por el agua.  
Nota: si el volumen fue 50 uL el volumen de ADN eluido será de 42 a 47 uL. El ADN puede ser concentrado por precipitación con etanol.
10. Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a 14,000 rpm. Descartar la columna y conservar el tubo con el ADN disuelto a 4 o a - 20 °C.

## APÉNDICE 6

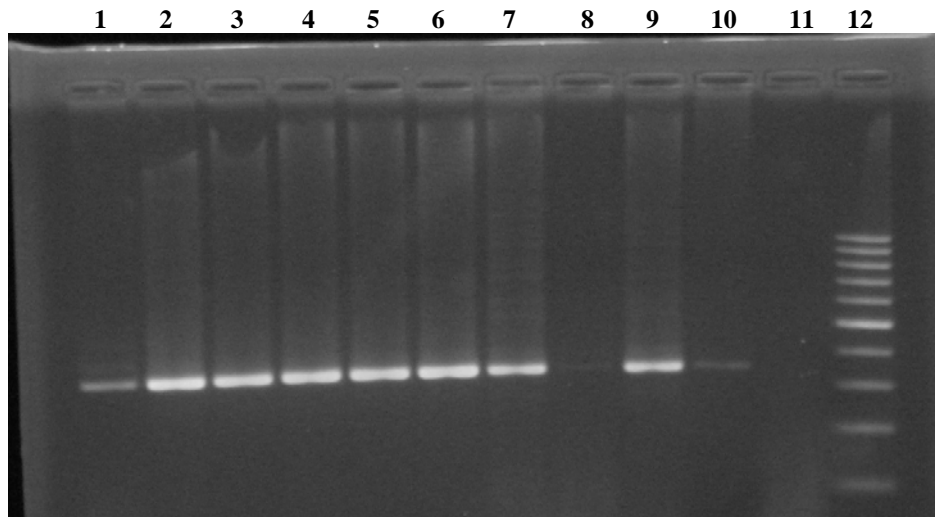


Fig.1: Productos de PCR de 345 bp. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 animales enfermos, carriles 9 y 10, animales sanos, Carril 11 blanco, Carril 12 Marcador de 100 bp.

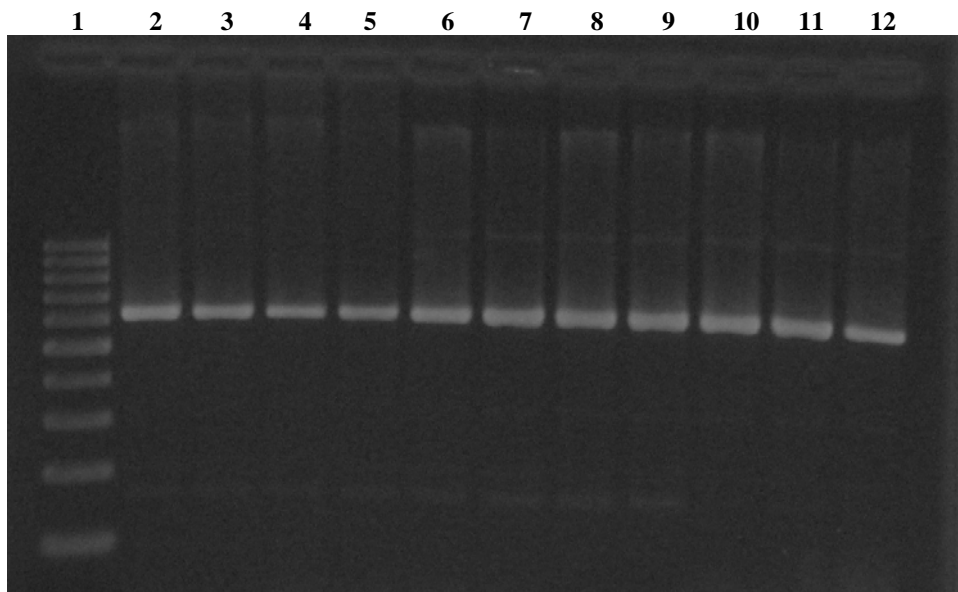


Fig.2: Productos de PCR de 625 bp. Carril 1 Marcador de 100 bp, carriles 1-9, animales enfermos, carriles 10 y 11, animales sanos.

Nota: Los productos de PCR fueron purificados con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System-Promega.

## APÉNDICE 7

**Cuadro 1. Detección de antígenos virales intralesionales en 25 neumonías agudas en alpacas**

| Edad                      | Agentes Virales |
|---------------------------|-----------------|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | <b>8/10</b>     |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | <b>9/15</b>     |
| <b>Total</b>              | <b>15/25</b>    |

**Cuadro 2. Detección de agentes virales en 15/25 neumonías agudas en alpacas**

| Edad                      | PI-3              | BRSV              | BAV-3              |
|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | 2/10              | 1/10              | 6/10               |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | 5/15              | 5/15              | 4/15               |
| <b>Total</b>              | <b>7/25 (28%)</b> | <b>6/25 (24%)</b> | <b>10/25 (40%)</b> |

PI-3: Virus Parainfluenza tipo 3

BRSV: Virus respiratorio sincitial Bovino

BAV-3: Adenovirus bovino tipo 3

**Cuadro 3. Interacción de agentes virales en neumonías agudas en alpacas**

| Edad                      | 1 Virus                                 | 2 Virus  | 3 Virus                 |
|---------------------------|---|--|-------------------------|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | PI-3 (n=2)<br>BRSV (n=0)<br>BAV-3 (n=5) | BAV-3+ BRSV (n=1)  | -                       |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | PI-3 (n=2)<br>BRSV (n=2)<br>BAV-3 (n=1) | PI-3+ BRSV (n=1)<br>PI-3+ BAV-3 (n=1)<br>BAV-3+ BRSV (n=1) | PI-3+ BRSV+ BAV-3 (n=1) |

## APÉNDICE 8

Coexistencia de virus y bacterias en cuadros de neumonías agudas en alpacas.

| Edad                      | PI-3   | BRSV                                | BAV-3  |
|---------------------------|--|-------------------------------------|--|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | Pm+ Mh+ <i>Staph</i> (n=1)<br><i>Strep</i> (n=1) | -                                   | Pm+ Mh+ <i>Staph</i> (n=1)<br>Pm+ <i>Staph</i> (n=1)<br>Mh (n=2) |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | <i>Strep</i> (n=1)<br>Pm+ <i>Staph</i> (n=1)     | Pm (n=1)<br>Pm+ <i>Strep.</i> (n=1) | <i>E.coli</i> (n=1)  |

| Edad                      | PI-3+ BRSV | PI-3+ BAV-3                 | BRSV+BAV3                         | PI-3+ BRSV+ BAV-3      |
|---------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| <b>Crías &lt; 6 meses</b> | -          | -                           | <i>Strep</i> + <i>Staph</i> (n=1) | -                      |
| <b>Crías &gt; 6 meses</b> | Pm (n=1)   | Pm + Mh+ <i>Staph</i> (n=1) | Pm + <i>Staph</i> (n=1)           | Mh+ <i>Staph</i> (n=1) |